

Lokalisation, Isolierung und in vitro Generierung von Assemblierungsintermediaten des Humanen 20S Proteasoms

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Biologe Benjamin Fricke
geboren am 18.09.1977 in Hannover

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marksches

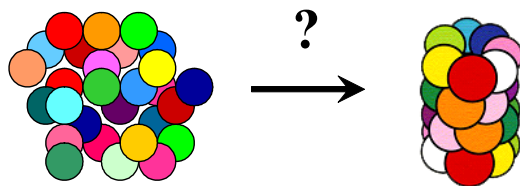
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Klotzel

2. Prof. Dr. Wolfgang Lockau

3. PD Dr. Michael Groll

Tag der mündlichen Prüfung: 16.8.2006



Niemand hat versprochen, dass es leicht wird..

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
Einleitung	7
1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	7
2 Das 20S Proteasom	8
2.1 Aufbau des 20S Proteasoms	8
2.2 Die katalytischen Zentren des 20S Proteasoms	11
3 Biogenese des 20S Proteasoms	11
3.1 Assemblierung des 20S Proteasoms in Prokaryoten	12
3.2 Assemblierung des 20S Proteasoms in Eukaryoten	13
3.3 Aufgaben der Propeptide	17
3.4 Maturierung der Propeptide	19
4 Intrazelluläre Lokalisation von proteasomalen Komplexen	20
4.1 Zelluläre Verteilung des 20S Proteasoms	20
4.2 Lokalisation von Biogeneseintermediaten	22
Material und Methoden	24
5 Geräte	24
6 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	24
6.1 Chemikalien und Proteine	24
6.2 Kits	25
6.3 Enzyme	25
6.4 Verbrauchsmaterialien	26
7 Oligonukleotide und Plasmide	26
7.1 Nucleotidsequenzen	26
7.2 Oligonucleotide	27
7.3 Konstrukte	28
8 Antikörper	29
9 Zellkultur	29
9.1 Kultur humaner Zelllinien (HeLa und CRL2429) und IFN γ Stimulation	29
9.2 Radioaktive Markierung von Hela Zellen mit ^{35}S	30
9.3 Liposomale Transfektion von POMP siRNA	30
10 Molekularbiologische Methoden	30
10.1 RT PCR	30
10.2 DNA-Amplifikation mittels PCR	30
10.3 Analytische und Präparative Agarose-Gelelektrophorese	31
10.4 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Gelbanden und wässrigen Lösungen	31
10.5 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen	31
10.6 Dephosphorylierung eines DNA-Vektors	32
10.7 Klenow Auffüllreaktion	32

10.8	Ligation	32
10.9	Plasmidpräparationen	32
10.10	Bestimmung der DNA Konzentration	32
10.11	Sequenzierung der Plasmide	33
10.12	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	33
10.13	Transformation von <i>E. coli</i> DH5α	33
11	Proteinbiochemische Methoden	34
11.1	Gewinnung von Gesamtproteinlysaten aus Mammaliazellen	34
11.2	TCA/NaDoc Proteinpräzipitation	34
11.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (nach Laemmli, 1975)	34
11.4	Western Blot Analyse und Immunodetektion	35
11.5	Trocknen von Gelen mit radioaktiv markierten Proteinen und Detektion	35
11.6	Ethanol Fällungen und 2D-Gelelektrophorese	36
11.7	Gradienten-Nativgelelektrophorese	37
11.8	Coomassie-Färbung von Proteingelen	38
11.9	Saccharosegradienten Zentrifugation	38
11.10	Immunpräzipitation von Proteinen	38
11.11	<i>In vitro</i> Expression im Retikulozytenlysat und “pull down” mit Mikrosomen	39
11.12	Liposomenpräparation und “pull down”	39
11.13	Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie	40
11.14	Fraktionierungen	41
11.14.1	Kernpräparationen	41
11.14.2	Präparation durch 100 000 g Zentrifugation	41
11.14.3	Mikrosomenanreicherung – Differentielle Zentrifugation	42
11.14.4	„floatation“ Experimente und waschen von Mikrosomen mit Salz	42
Ergebnisse		44
12	<i>In vitro</i> Generierung von proteasomalen Biogeneseintermediaten	44
12.1	Expression aller proteasomaler Untereinheiten und bekannter Biogeneseenzyme im Retikulozytenlysat	44
12.2	Auftrennung der Biogeneseintermediate in einem Saccharosegradienten	45
12.3	Nativgelelektrophorese der <i>in vitro</i> generierten Komplexe	47
12.4	Immunpräzipitation und 2D-Gel Analyse der Komplexe	48
13	Charakterisierung von proteasomalen Biogeneseintermediaten <i>in vivo</i>	50
13.1	Immunpräzipitation und 2D-Gel Analyse des 13S Vorläuferkomplexes	50
13.2	Zeitlicher Verlauf des Untereinheiteneinbaus in proteasomale Komplexe in HeLa Zellen	52
13.3	2D-Gel Analyse von Biogeneseintermediaten und 20S Proteasomen nach unterschiedlich langer Markierung mit radioaktivem ³⁵ S	54
14	Subzelluläre Lokalisation von proteasomalen Biogeneseintermediaten	59
14.1	Induktion von Immunoproteasomen nach Stimulation von HeLa Zellen mit IFNγ	59
14.2	Lokalisation proteasomaler Biogeneseintermediate in HeLa und CRL2429 Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz	60
14.3	Zellfraktionierung und Detektion von Biogenesemarkern in HeLa Zellen	63

14.4	„floatation“-Experimente mit Mikrosomen und Biogenesintermediaten	64
14.5	Sensitivität der Assoziation von Vorläuferkomplexen an Membranen durch POMP Entzug und Magnesium-Ionen Mangel	66
14.6	Beständigkeit der 13S Vorläuferkomplex-Struktur nach Magnesiumentzug	68
14.7	POMP assoziiert quantitativ mit Hundepankreasmikrosomen (HPM)	69
14.8	Detektion einer membraninteragierenden Proteindomäne von POMP und Charakterisierung einer Membran-Interaktion bzw. Integration	71
14.9	Assoziation von POMP an Mikrosomen unter Hochsalzbedingungen	72
14.10	Assoziation <i>in vitro</i> erzeugter Komplexe mit HPM	73
14.11	Coimmunpräzipitation mit Vorläuferkomplexen assoziierter Proteine	74
Diskussion		76
15	<i>In vitro</i> Formierung von Assemblierungsintermediaten	76
16	Komplexbildung und Reihenfolge des Untereinheiteneinbaus in 20S Proteasomen <i>in vivo</i>	78
17	Die Rolle akzessorischer Faktoren für den Assemblierungsvorgang	83
18	Lokalisation von 20S Proteasomen und ihren Assemblierungsintermediaten	84
18.1	20S Proteasomen und Vorläuferkomplexe im Cytoplasma	84
18.2	20S Proteasomen und Vorläuferkomplexe im Zellkern	85
18.3	Assoziation proteasomaler Komplexe mit dem Endoplasmatischen Retikulum	86
19	Lokalisierte Assemblierungsvorgänge	90
20	Interaktion von POMP mit Membranen	92
21	Die essentielle Rolle von POMP während des Assemblierungsprozesses	94
22	Ausblick	95
Literatur		97
Abkürzungsverzeichnis		106
Lebenslauf		107
Publikationsliste		108
Danksagung		109

Zusammenfassung

Das 20S Proteasom bildet den Protein degradierenden Teil des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) und ist damit an wichtigen zellulären Prozessen wie Genexpressionskontrolle, Zellzykluskontrolle, Apoptose, Peptidgenerierung zur MHC Klasse I Präsentation und Degradation fehlgefalteter Proteine beteiligt.

Die einzelnen Schritte der Biogenese des 20S Proteasoms in Eukaryoten sind bisher nur in Ansätzen verstanden. In dieser Arbeit wird die Untereinheitenzusammensetzung von Biogeneseintermediaten und ihre subzelluläre Lokalisation und Organisation in humanen Zelllinien untersucht. Durch die Etablierung eines *in vitro* Systems konnten distinkte Assemblierungsintermediate humaner Proteasomen generiert werden und ein α -Ring als früheres Intermediat im *in vitro* System nachgewiesen werden. Aufschluss über den weiteren Vorgang der Assemblierung wurden durch *in vivo* Experimente mit radioaktiv markierten HeLa Zellextrakten gewonnen. So konnten vor allem neu synthetisierte und zuletzt eingebaute Untereinheiten identifiziert werden. Hierzu gehören die Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 7$, die aufgrund ihrer in *trans* agierenden C-terminalen Verlängerungen einen Dimerisierungsprozess zweier Halbproteasom-Vorläuferkomplexe forcieren. Darüber hinaus kann die Untereinheit $\alpha 1$ aufgrund der gewonnen Erkenntnisse als die wahrscheinlich den α -Ring schließende Untereinheit im Vorläuferkomplex postuliert werden.

Proteasomale Assemblierungsintermediate konnten außerdem durch immuncytochemische und biochemische Methoden am ER von humanen Zelllinien lokalisiert werden. Dabei scheint dem Assemblierungsfaktor POMP eine Schlüsselrolle zuzukommen, da dieser eine Assoziation der Vorläuferkomplexe mit dem ER erst ermöglicht.

In dieser Arbeit sind weitere Schritte des komplexen Biogenese-Vorgangs konstitutiver 20S Proteasomen in humanen Zelllinien aufgeklärt worden und es konnte erstmals die subzelluläre Lokalisation für Assemblierungsintermediate in humanen Zellen beschrieben werden.

Einleitung

1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das Ubiquitin-Proteasom-System stellt den wichtigsten regulierten Degradationsweg in Eukaryoten dar und hydrolysiert den größten Teil aller zellulären Proteine. Durch seine mannigfaltige Substratspezifität ist das UPS an vielen essentiellen Vorgängen in der Zelle beteiligt. Dazu zählen Apoptose, Differenzierung, Zellteilung, Transkription und Stressantwort (Glickman und Ciechanover, 2002; Klotzel, 2001; Rock *et al.*, 2002). Neben kurzlebigen, vor allem regulatorischen Proteinen, RDPs (rapidly degraded proteins), baut das UPS vor allem neusynthetisierte und fehlgefaltete Proteine, so genannte DRiPs (defective ribosomal products) ab (Schubert *et al.*, 2000; Yewdell, 2001; Yewdell, 2003). Einige der generierten Peptide dienen als Liganden für den „Major Histocompatibility Complex Class I“ (MHC I) und werden an der Zelloberfläche den cytotoxischen T-Zellen präsentiert, wodurch es zu einer Identifizierung und Zerstörung karzinogener bzw. infizierter Zellen kommt (Klotzel und Ossendorf, 2004).

Den hydrolytisch aktiven Teil des Systems bildet das 26S Proteasom. Dieses ist zusammengesetzt aus dem 20S „core“ Partikel und zwei peripheren 19S Regulatorkappen (Abb. 1) (Peters *et al.*, 1993; Schubert *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 1993). Das 20S Proteasom besteht aus vier heptameren Ringen und enthält die katalytisch aktiven Untereinheiten. Der 19S Regulator ist für die Substraterkennung (Deveraux *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1998), Substratentfaltung und die Translokation in die Kammern des 20S Proteasoms verantwortlich (Glickman und Ciechanover, 2002). Er besteht aus zwei Teilen, dem „lid“ und dem „base“ (Ferrell *et al.*, 2000; Glickman *et al.*, 1998). Das mit dem Proteasom assoziierte „base“ beherbergt sechs AAA-ATPasen, die ATP für die energieabhängige Entfaltung der Substrate hydrolysieren (Braun *et al.*, 1999; Glickman *et al.*, 1998). Die meisten Proteine, die durch das 26S Proteasom degradiert werden sollen, werden zuvor durch das Anhängen einer Polyubiquitinkette markiert. Dieser Vorgang wird durch die Enzyme der Ubiquitinierungskaskade bestehend aus einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1), einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) und einer Ubiquitin-Ligase (E3) ausgeführt (Pickart und Eddins, 2004; Weissman, 2001).

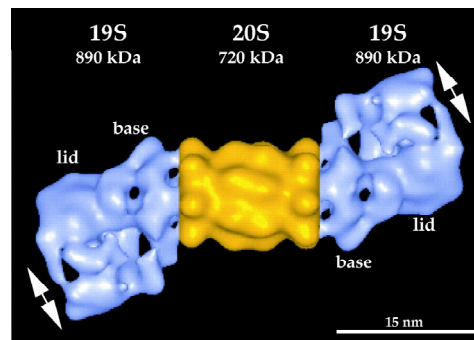


Abb. 1 Struktur des 26S Proteasom, generiert aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen des 26S Proteasoms aus *Drosophila melanogaster* und der Kristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (Voges *et al.*, 1999)

Neben dem 19S Komplex existieren noch weitere regulatorische Komplexe, die die Aktivität und Spezifität des 20S Proteasoms beeinflussen. Diese agieren in der Zelle parallel oder autark zu der 19S Regulatorkappe. Hierzu gehört zum Beispiel der 11S Regulator (Dubiel *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1992). Dieser besteht aus nur zwei Untereinheiten, PA28 α und PA28 β , und wird verstärkt nach Stimulation von Zellen mit IFN γ exprimiert (Nandi *et al.*, 1997; Strehl *et al.*, 2005). Auch das 20S Proteasom wird durch Cytokinstimulation beeinflusst: zu den drei konstitutiven katalytischen Untereinheiten werden drei alternative Untereinheiten, so genannte Immununtereinheiten exprimiert (Aki *et al.*, 1994; Hendil *et al.*, 1998) und in *de novo* synthetisierte 20S Proteasomen kooperativ eingebaut (Griffin *et al.*, 1998). Der Komplex besitzt dadurch eine veränderte Spaltspezifität. Durch diesen Mechanismus kann die Zelle auf Infektions- und Entzündungsprozesse besser reagieren (Kloetzel und Ossendorp, 2004). Weitere assoziierte Proteine sind der Aktivator PA200 (Ustrell *et al.*, 2002) und der Inhibitor PI31 (McCutchen-Maloney *et al.*, 2000; Zaiss *et al.*, 1999).

2 Das 20S Proteasom

2.1 Aufbau des 20S Proteasoms

Die Grundstruktur und die Ausmaße aller bekannten Kristallstrukturen von 20S Proteasomen aus Archaeen, Eubakterien und Eukaryoten sind nahezu identisch (Groll *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2004; Lowe *et al.*, 1995; Unno *et al.*, 2002; Voges *et al.*, 1999). Während die Komplexstruktur hochkonserviert vorliegt, hat sich die Anzahl unterschiedlicher Untereinheiten durch Genduplikationen während der Evolution vervielfacht (Abb. 2). Der zylindrische

Komplex ist aus vier heptameren Ringen aufgebaut, wobei die innen liegenden Ringe aus β -Untereinheiten und die außen liegenden Ringe aus α -Untereinheiten aufgebaut sind.

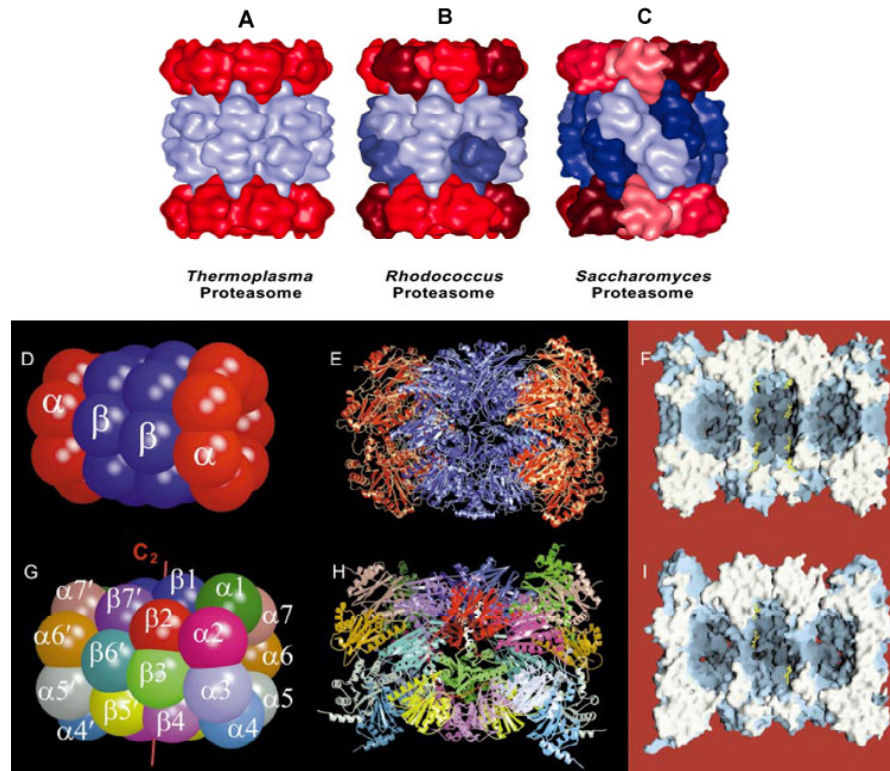


Abb. 2 Vergleich der hochkonservierten Komplexstrukturen von 20S Proteasomen aus *Thermoplasma acidophilum* (A, D), *Rhodococcus erythropolis* (B) und *Saccharomyces cerevisiae* (C, G) (Bochtler et al., 1999; Voges et al., 1999).

Während das 20S Proteasom des Archaeums *Thermoplasma acidophilum* aus nur einer α - und einer β -Untereinheit besteht (Zwickl et al., 1992a; Zwickl et al., 1992b) ist das 20S Proteasom des Eubakteriums *Rhodococcus erythropolis* aus vier unterschiedlichen Untereinheiten, zwei α - und zwei β -Untereinheiten, aufgebaut (Tamura et al., 1995; Voges et al., 1999). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist die Diversität der Untereinheiten bereits auf je sieben unterschiedliche α - und β -Untereinheiten gestiegen, so dass sich der Komplex aus 14 verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt. Die genaue Anordnung der Untereinheiten zueinander konnte durch die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur ermittelt werden (Groll et al., 1997). Im Unterschied zum *Thermoplasma* 20S Proteasom befinden sich keine Öffnungen in der Mitte der α -Ringe, da diese durch die N-Termini der α -Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ verschlossen sind (Groll et al., 1997). Eine Mutation im N-Terminus von $\alpha 3$ bewirkt allerdings

eine Öffnung des α -Ringes mit einem dem *Thermoplasma acidophilum* 20S Proteasom ähnlich großem Durchmesser (Groll *et al.*, 2000). Es bedarf *in vivo* demnach eines so genannten „gating“ Prozesses, der zur Öffnung des α -Ringes führen muss, um den Substrateintritt zu ermöglichen. Gezeigt wurde eine Öffnung der Pore durch den PA200 Komplex (Ortega *et al.*, 2005), durch den PA26 Regulator aus *Trypanosoma brucei* (Whitby *et al.*, 2000) und indirekt über Aktivitätsmessungen durch den 19S Regulator (Groll *et al.*, 2000). Es muss unterschiedliche Mechanismen zur Öffnung *in vivo* geben, da sowohl regulatorassoziierte (Kloetzel, 2001) als auch 20S Proteasomen allein Substrate abbauen können (Coffino, 2001).

Die einzige aufgeklärte Kristallstruktur eines Mammalia 20S Proteasoms ist die des Rindes (Abb. 3) (Unno *et al.*, 2002). Dessen Struktur ist dem des Proteasoms von *S. cerevisiae* sehr ähnlich. Die Untereinheiten sind identisch angeordnet und auch die Struktur der katalytischen Zentren spricht für eine nahezu identische Enzymaktivität. Nennenswerte Strukturunterschiede zwischen dem 20S Proteasom aus *S. cerevisiae* und dem Rind gibt es vor allem in den Untereinheiten $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 6$ und $\beta 7$. Es wird diskutiert, dass diese Unterschiede den Einbau der in Mammalia zusätzlich existierenden Immunountereinheiten $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ erleichtern (Unno *et al.*, 2002). Diese ersetzen nach Induktion durch $\text{IFN}\gamma$ vermehrt die konstitutiven Untereinheiten im 20S Proteasom und bilden so genannte Immunoproteasomen (Kloetzel und Ossendorp, 2004). Das humane 20S Proteasom entspricht wahrscheinlich in der Zusammensetzung und dem Aufbau sehr genau dem 20S Proteasom aus Rindern, allerdings ist bisher keine Röntgenkristallstruktur für das humane 20S Proteasom gelöst worden.

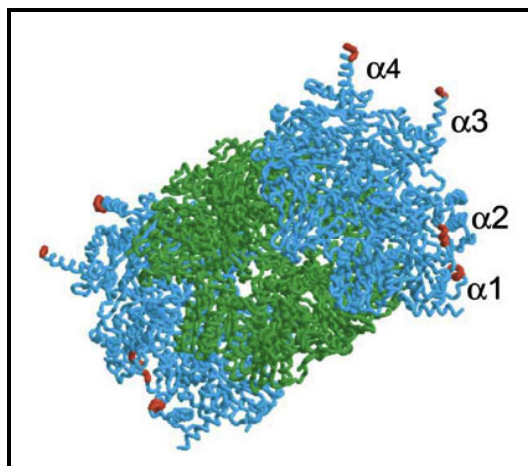


Abb. 3 Kristallstruktur des 20S Proteasom aus Rind mit rot markierten „nuclear localisation signals“ (NLS) (Unno *et al.*, 2002).

2.2 Die katalytischen Zentren des 20S Proteasoms

Das 20S Proteasom gehört zu der Familie der Ntn-Hydrolasen (N-terminale nukleophile Hydrolasen) (Groll *et al.*, 1997; Seemuller *et al.*, 1995a; Seemuller *et al.*, 1995b). Die Hydrolyse erfolgt mittels endständiger Threonine, die in die innere Kavität ragen (Groll *et al.*, 1997; Lowe *et al.*, 1995; Unno *et al.*, 2002). In *T. acidophilum* sind alle 14 β -Untereinheiten aktiv, während in Eukaryoten nur die Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ bzw. deren Homologe $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ aktiv sind (Baumeister *et al.*, 1998; Kloetzel und Ossendorp, 2004). Die katalytischen Zentren befinden sich in eukaryotischen Proteasomen in den so genannten S1 Taschen. Sie geben durch ihre jeweilige Aminosäurezusammensetzung den katalytischen Zentren eine charakteristische Spaltpräferenz (Groll *et al.*, 2005). Durch die Hydrolyse fluorogener Substrate und gleichzeitigem Einsatz von Inhibitoren konnten folgende Aktivitäten zugeordnet werden: eine peptidylglutamylspaltende Aktivität (Spaltung nach Glutamat) wird mit $\beta 1$ assoziiert, eine trypsinähnliche Aktivität (Spaltung nach basischen Aminosäuren) mit $\beta 2$ und eine chymotrypsinähnliche Aktivität mit $\beta 5$ (Spaltung nach hydrophoben Aminosäuren) (Dahlmann *et al.*, 1986; Orłowski *et al.*, 1993; Orłowski und Wilk, 2000; Wilk und Orłowski, 1983). Bei diesen Aktivitäten handelt es sich allerdings lediglich um Präferenzen. Das Proteasom kann Substrate nach nahezu jeder beliebigen Aminosäure spalten (Wenzel *et al.*, 1994).

Immunoproteasomen haben eine abweichende Peptidaseaktivität (Cerundolo *et al.*, 1995), was eventuell zu einer verbesserten Generierung immunogener Peptide und verstärkten Beladung von MHC I Molekülen führt, die dann zur Zelloberfläche transportiert und dort cytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert werden können (Fehling *et al.*, 1994; Kloetzel und Ossendorp, 2004; Kuckelkorn *et al.*, 1995; Sibille *et al.*, 1995).

3 Biogenese des 20S Proteasoms

Die Biogenese des 20S Proteasoms ist in drei große Bereiche unterteilbar: in die Proteinexpression, den Assemblierungsvorgang und die Maturierung, durch die schließlich die proteolytische aktiven Threoninreste freigelegt werden. Die Assemblierung des aus 28 Untereinheiten bestehenden 20S Proteasoms bedarf einer präzisen Koordination. In Eukaryoten müssen 14 verschiedene Untereinheiten an die richtigen Positionen im Komplex

dirigiert werden. Verschiedene Assemblierungswege sind für unterschiedliche Modellorganismen postuliert worden und sollen im folgenden näher erläutert werden.

3.1 Assemblierung des 20S Proteasoms in Prokaryoten

Die Untereinheiten von *T. acidophilum* können heterolog und funktionell in *Escherichia coli* exprimiert werden. Bei singulärer Expression der Untereinheiten führte nur die heterologe Expression der α -Untereinheit zu einer Komplexbildung. Es formierten sich heptamere α -Ringe, die sich wiederum zu Doppelringstrukturen zusammenlagerten (Zwickl *et al.*, 1994). Wurden die α - und die β -Untereinheit parallel heterolog exprimiert, konnten sich Doppelringstrukturen aus einem α - und einem β -Ring formieren, die durch eine Konformationsänderung in der Lage waren zu dimerisieren und maturierte Proteasomen zu generieren (Zwickl *et al.*, 1994; Zwickl *et al.*, 1992b). Die Bildung einer Ringstruktur nach heterologer Expression konnte auch für die α -Untereinheit aus *Archaeoglobus fulgidus* beobachtet werden (Groll *et al.*, 2003). Auf Basis dieser Daten wird als Biogeneseintermediat eine α -Ringstruktur diskutiert, die allerdings bisher nicht in den Organismen selbst nachgewiesen werden konnte (Abb. 4). Ausgeprägte Konformationsänderungen, die sich während oder nach einer Dimerisierung zweier Halbproteasomen-Vorläuferkomplexe ereignen, konnten auch am Beispiel des 20S Proteasoms aus *A. fulgidus* gezeigt werden (Mullapudi *et al.*, 2004).

Das aus je zwei α - und β -Untereinheiten bestehende 20S Proteasom aus *Rhodococcus erythropolis* (Tamura *et al.*, 1995) hingegen scheint über einen alternativen Assemblierungsweg zu verfügen. Die heterologe Expression der α -Untereinheiten in *E. coli* singulär oder in Kombination führte zu keiner Komplexbildung (Zuhl *et al.*, 1997b). Auch die β -Untereinheiten bildeten nach heterologer Expression in jeder Kombination keine Komplexe. Jedoch konnten nach jeder möglichen Kombination von α - und β -Untereinheiten 20S Proteasomen nachgewiesen werden (Zuhl *et al.*, 1997b).

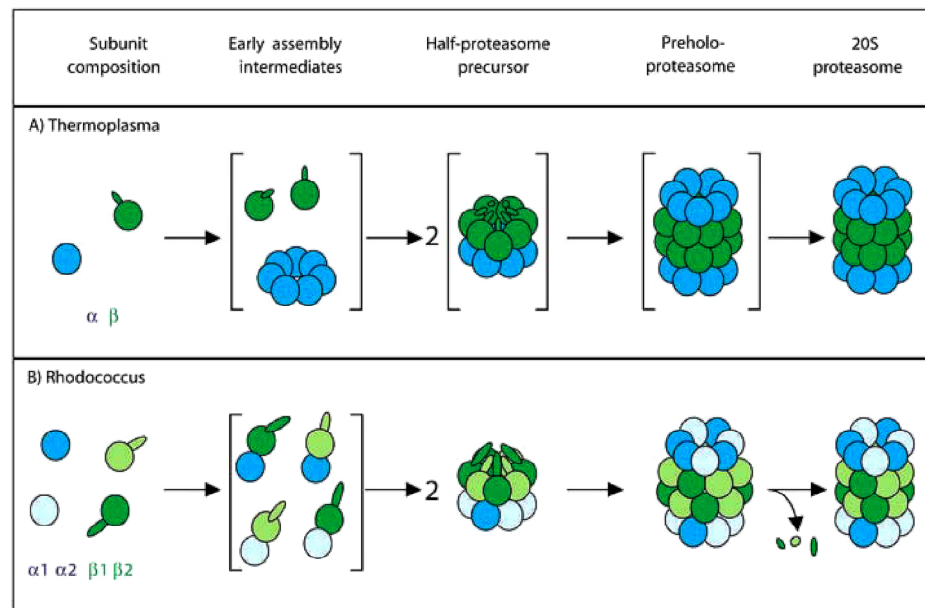


Abb. 4 Modelle der Assemblierung des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (A) und *Rhodococcus erythropolis* (B) (Heinemeyer et al., 2004).

Das legt eine Komplexbildung über α - β Heterodimere nahe (Lupas *et al.*, 1997; Zuhl *et al.*, 1997a; Zuhl *et al.*, 1997b) (Abb. 4). Bezeichnend für Assemblierungsvorgänge in Prokaryoten ist, dass eine Komplexbildung anscheinend ohne akzessorische Proteine auskommt und die Untereinheiten allein durch spontane Assoziation und spezifische Interaktionen an die richtige Position dirigiert werden, um ein vollständiges 20S Proteasom zu formieren.

3.2 Assemblierung des 20S Proteasoms in Eukaryoten

Durch den komplexeren Aufbau des 20S Proteasoms in Eukaryoten aus 14 verschiedenen Untereinheiten sind für Assemblierungsvorgänge akzessorische Proteine notwendig. In Assemblierungsintermediaten konnten Chaperone der Hsp70 und Hsp 90 Familien (Heink, 2005; Schmidt und Kloetzel, 1997; Schmidt *et al.*, 1997; Schmidtke *et al.*, 1997) und der 14-3-3 Familie (Heink, 2005) identifiziert werden. Ein bisher nur in proteasomalen Vorläuferkomplexen gefundenes Protein ist UMP1p in *S. cerevisiae* (Ramos *et al.*, 1998) beziehungsweise sein humanes Homolog POMP (*proteasome maturation protein*) (Burri *et al.*, 2000; Griffin *et al.*, 2000; Witt *et al.*, 2000). Der in *S. cerevisiae* agierende Assemblierungsfaktor UMP1p interagiert mit dem Propeptid der $\beta 5$ Untereinheit. Eine Deletion von UMP1p führt unter Stressbedingungen zu einem verminderten Wachstum und

einer Akkumulation von proteasomalen Vorläuferkomplexen. Durch gleichzeitigen Verlust des $\beta 5$ Propeptids wird dieser Effekt allerdings wieder aufgehoben. UMP1p gilt in *wt*-Stämmen als das erste Substrat des 20S Proteasoms nach vollständiger Maturierung der β -Untereinheiten (Ramos *et al.*, 1998). Die für die Assemblierung bedeutende Interaktion zwischen dem $\beta 5$ Propeptid und POMP konnte auch für das humane System nachgewiesen werden (Heink *et al.*, 2005).

Durch eine Protein-A Markierung von $\alpha 4$ und Isolierung von Assemblierungsintermediaten konnte eine Zusammensetzung von proteasomalen Vorläuferkomplexen aus *S. cerevisiae* abgeleitet werden (Lehmann *et al.*, 2002). Frühe mit UMP1p assoziierte Assemblierungsintermediate enthalten in stöchiometrischer Menge die Untereinheiten $\alpha 1-7$ und $\beta 1-5$. Die Untereinheiten $\beta 6$ und $\beta 7$ konnten nicht detektiert werden. Alle β -Untereinheiten, die als Proform synthetisiert werden, konnten nur im nicht maturierten Zustand nachgewiesen werden (Lehmann *et al.*, 2002). In späten UMP1p assoziierten Assemblierungsintermediaten, die der Größe nach einem vollständigen 20S Komplex mit Proformen und akzessorischen Proteinen, einem so genannten Preholoproteasom, zuzuordnen sind, konnten alle 14 verschiedenen Untereinheiten nachgewiesen werden, wobei sowohl Propeptid tragende als auch maturierte β Untereinheiten identifiziert werden konnten. Das Proteasom in *S. cerevisiae* wird offenbar als Assemblierungsintermediat in den Zellkern transportiert, in dem es unter Bindung an Blm3, ein Hefehomolog zu PA200, bindet und die letzten Maturierungsschritte vollzieht (Fehlker *et al.*, 2003). Frühe Oligomere oder α -Ringe konnten in *S. cerevisiae* bisher nicht gefunden werden.

Die Bildung heptamerer Ringe nach heterologer Expression in *E. coli* konnte für die Untereinheiten $\alpha 5$ und $\alpha 6$ aus *T. brucei* (Huang *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 1999) und die humane $\alpha 7$ Untereinheit beobachtet werden (Gerards *et al.*, 1997). Es lagerten sich allerdings immer mehrere Ringe zu hochmolekularen Komplexen zusammen. Die humane $\alpha 7$ Untereinheit befähigte auch die sonst als monomer vorliegenden Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 6$ heterooligomere Ringe zu formieren, die allerdings eine sehr variable Zusammensetzung aufwiesen (Gerards *et al.*, 1998a; Gerards *et al.*, 1997). Diese Daten führten zu der Postulierung eines α -Ringes als humanes Assemblierungsintermediat, während aber immer noch ein alternatives Modell über Heterodimere aus α - und β -Untereinheiten diskutiert wird (Gerards *et al.*, 1998b; Heinemeyer *et al.*, 2004; Heink, 2005).

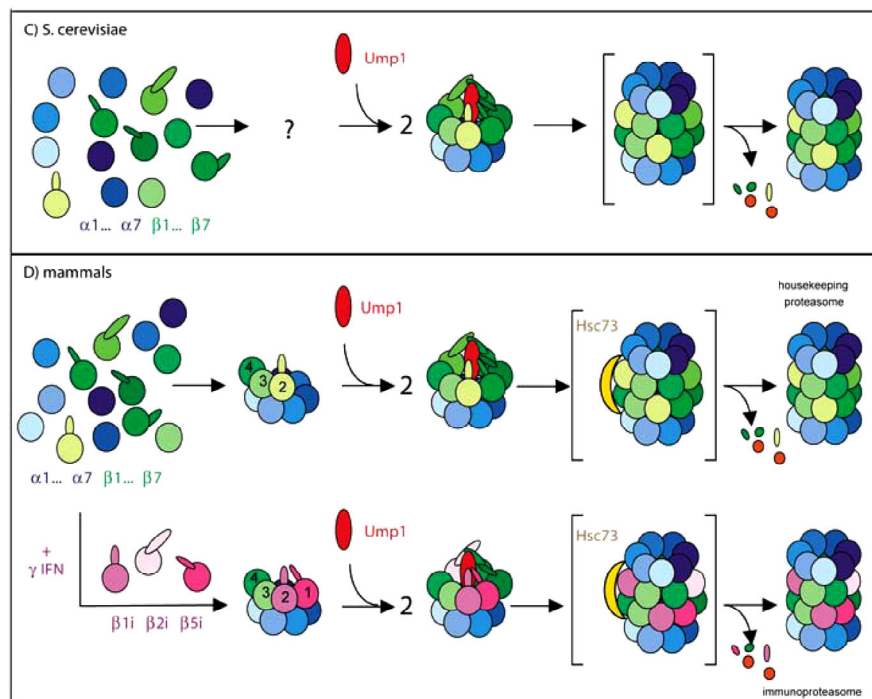


Abb. 5 Modelle der Assemblierung der 20S Proteasomen aus *S. cerevisiae* (C) und Mammalia (D) (Heinemeyer et al., 2004).

Aus murinen Zellen konnten als erstes aus 10 proteasomalen Untereinheiten zusammengesetzte Komplexe isoliert werden (Frentzel *et al.*, 1994). Diese bestehen aus einem kompletten α -Ring und den β -Untereinheiten Pro β 2, β 3, und β 4 sowie dem Assemblierungsprotein POMP und entsprechen damit der Zusammensetzung dem so genannten 13S Vorläuferkomplex (Frentzel *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1997; Schmidtke *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1995). Nandi *et al.* (1997) gelang es, einen Antikörper gegen eine 13S Vorläuferkomplex spezifische Konformation der $\alpha 7$ Untereinheit zu generieren und diesen Komplex durch Immunpräzipitation zu isolieren und zu analysieren. Dass $\beta 1$ und $\beta 7$ zu den spät eingebauten Untereinheiten während des proteasomalen Assemblierungsvorgangs gehören, ist insofern sinnvoll, als dass beide humanen Untereinheiten C-terminale Verlängerungen tragen, die mit den in *trans* liegenden β -Ringern interagieren und demnach eine Dimerisierung zweier Halbproteasom-Vorläuferkomplexe fördern dürften (Abb. 6) (Unno *et al.*, 2002). Hier gibt es deutliche Unterschiede zum 20S Proteasom aus *S. cerevisiae*, in dem die Untereinheiten $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$ in *trans* interagieren. Auch diese Untereinheiten sind in *S. cerevisiae* die zuletzt in einen Halbproteasom-Vorläuferkomplex eingebauten Untereinheiten (Lehmann *et al.*, 2002). Nach Inkorporation

der fehlenden β -Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 6$ und $\beta 7$ entsteht ein so genannter Halbproteasom-Vorläuferkomplex. Mit dem humanen Halbproteasom-Vorläuferkomplex assoziiert wurde das Protein Hsc73 (Schmidtke *et al.*, 1997) und das Assemblierungsprotein POMP (Burri *et al.*, 2000; Griffin *et al.*, 1998; Witt *et al.*, 2000) beschrieben. Der Prozess der Dimerisierung scheint erheblich durch den Einbau von $\beta 7$ beeinflusst zu werden. Sowohl im 20S Proteasom von *S. cerevisiae* als auch von Mammalia interagiert der C-Terminus von $\beta 7$ mit den im gegenüberliegenden Ring lokalisierten β -Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$ (Groll *et al.*, 1997; Unno *et al.*, 2002) und eine Deletion des C-Terminus von $\beta 7$ in *S. cerevisiae* führt zu einer verminderten Dimerisierung und Anhäufung von Halbproteasom-Vorläuferkomplexen (Ramos *et al.*, 2004).

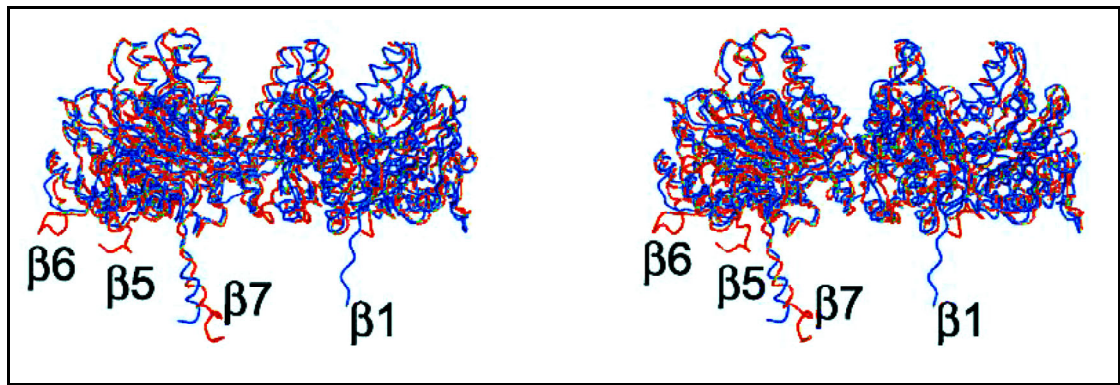


Abb. 6 Vergleich C-terminaler Verlängerungen der proteasomalen β -Untereinheiten von *S. cerevisiae* (rot) und des Rindes (blau) (Unno 2004).

Für humane Zellen wurde erst vor kurzem ein α -Ring als humanes Assemblierungsintermediat isoliert. Mit dem α -Ring wurden zwei weitere akzessorische Proteine PAC1 und PAC2 identifiziert, die offenbar eine Rolle bei der koordinierten Assemblierung des α -Ringes spielen (Hirano *et al.*, 2005). Es konnte auch der in murinen Zellen bereits nachgewiesene 13S Vorläuferkomplex aus humanen Zellen isoliert werden (Schmidt *et al.*, 1997; Schmidtke *et al.*, 1997). Darüber hinaus ist die Proteasomenassemblierung in humanen Zellen kaum verstanden und stützt sich auf Theorien aus den oben beschriebenen Ergebnissen.

3.3 Aufgaben der Propeptide

Alle katalytischen β -Untereinheiten werden als Proproteine synthetisiert (Chen und Hochstrasser, 1996; Ditzel *et al.*, 1998; Schmidtke *et al.*, 1996; Seemuller *et al.*, 1996). Die N-terminalen Propeptide schützen zum einen die Zelle vor unkontrollierter Proteolyse und zum anderen die endständigen Threonine vor einer N- α -Acetylierung (Arendt und Hochstrasser, 1999; Jager *et al.*, 1999). Weiterhin könnten einige Propeptide eine intramolekulare, chaperonähnliche Funktion bei der Faltung der Untereinheiten übernehmen, wie sie für das $\beta 5$ Propeptid postuliert wurde (Chen und Hochstrasser, 1996). Unterschiedlich wichtige Funktionen werden den Propeptiden bei der Assemblierung zugeschrieben. Eine Deletion des nur acht Aminosäuren langen Propeptids der β -Untereinheit von *T. acidophilum* hat nur einen geringen Einfluss auf die Assemblierung (Grziwa *et al.*, 1994; Zwickl *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu führt eine Deletion des langen Propeptids der β -Untereinheiten von *R. erythropolis* zu einem stark verlangsamten und eingeschränkten Assemblierungsprozess, was aber durch Zugabe des Propetids *in trans* wieder aufgehoben wird (Zuhl *et al.*, 1997a). Durch Auflösung der Kristallstruktur des 20S Proteasoms aus *R. erythropolis* mit funktionalen Propeptiden konnte eine Interaktion des langen Propeptids jeder β -Untereinheit mit zwei benachbarten darüber liegenden α -Untereinheiten nachgewiesen werden (Abb. 7). Diese Interaktion scheint die gering ausfallenden α - α Interaktionsflächen auszugleichen (Kwon *et al.*, 2004). Dadurch wird die These unterstützt, dass 20S Proteasomen aus *R. erythropolis* Proteasomen über kleinere heterolog zusammengesetzte Oligomere aus α - und β -Untereinheiten assemblieren.

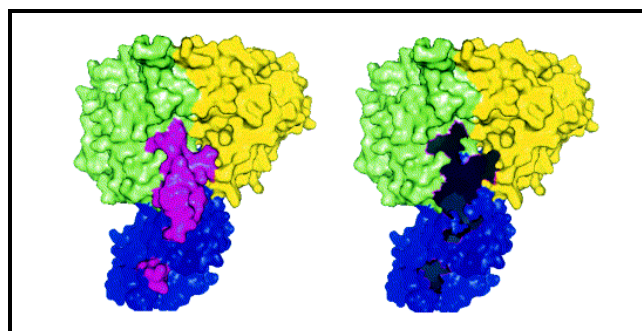


Abb. 7 Strukturelle Darstellung des mit zwei α -Untereinheiten interagierenden *Rhodococcus erythropolis* Propeptids (lila) (Kwon *et al.*, 2004)

Mit Ausnahme von $\beta 3$ und $\beta 4$ werden in Eukaryoten alle β -Untereinheiten als Proformen synthetisiert. Es wird jedoch nur bei den Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ bzw. den homologen Immunountereinheiten nach Abspaltung des Propeptids ein endständiges Threonin freigesetzt. Durch Deletionsstudien in *S. cerevisiae* konnte den Propeptiden der verschiedenen β -Untereinheiten eine hierarchische Bedeutung zugeordnet werden. Die Deletion der Propeptide von $\beta 1$ und $\beta 7$ hatten keine Auswirkungen auf das Wachstum der Hefen, während es durch die Deletion des $\beta 2$ Propeptids zu einem verminderten Wachstum bei höheren Temperaturen kam (Arendt und Hochstrasser, 1999; Jager *et al.*, 1999). Eine Deletion des $\beta 5$ Propeptids führte zur Lethalität. Eine Koexpression des Propeptids in *trans* allerdings kompensierte die Wirkung der N-terminalen Deletion (Chen und Hochstrasser, 1996; Jager *et al.*, 1999).

In humanen Zellen wurden bisher nur Studien mit Propeptiden der durch IFN γ induzierbaren Immunountereinheiten durchgeführt. Es wurden Fusionsproteine mit ausgetauschter Propeptidsequenz generiert, um den Einfluss der Propeptide auf die Inkorporation zu untersuchen. Sind die Propeptide von $\beta 5$ und $\beta 5i$ ausgetauscht worden, wurden die Untereinheiten in das dem Propeptid entsprechende Proteasom eingebaut: $\beta 5$ in das Immunoproteasom und $\beta 5i$ in das konstitutive Proteasom (Kingsbury *et al.*, 2000). Auch die Fusion des Propeptids von $\beta 2$ and $\beta 2i$ führte zum Einbau von $\beta 2i$ in das konstitutive Proteasom (De *et al.*, 2003). Dadurch kann diesen drei Propeptiden eine gewisse Funktion für die Positionierung der zugehörigen Untereinheiten im Komplex zugeordnet werden. Deletionen der $\beta 1i$ (Schmidt *et al.*, 1999) und $\beta 5i$ (Witt *et al.*, 2000) Propeptids und die Erzeugung der Chimären Pro $\beta 5i$ - $\beta 1i$ (Schmidtke *et al.*, 1996) und Pro $\beta 1i$ - $\beta 5i$ (Witt *et al.*, 2000) führten zu keinen Positionsverschiebungen im Komplex, sondern verringerten lediglich die Effizienz des Assemblierungs- und Maturierungsvorgangs.

Die Propeptide übernehmen somit unterschiedlich essentielle Aufgaben während des Assemblierungsvorgangs und aufgrund ihrer geringen Konservierung wahrscheinlich auch unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Organismen.

3.4 Maturierung der Propeptide

Die Assemblierung zweier Halbproteasom-Vorläuferkomplexe ist die Voraussetzung für die Prozessierung der β -Propeptide im Preholoproteasom (Chen und Hochstrasser, 1996).

Während die Prozessierung der später katalytisch aktiven Untereinheiten einem autokatalytischen Prozess unterliegt (Chen und Hochstrasser, 1996; Groll *et al.*, 1999; Schmidtke *et al.*, 1996), ist die Prozessierung der Propeptid tragenden inaktiven Untereinheiten $\beta 6$ und $\beta 7$ ein intermolekularer Vorgang durch benachbarte bereits aktivierte Untereinheiten (Groll *et al.*, 1999; Heinemeyer *et al.*, 1997). Dass dem Maturierungsvorgang der Propeptide ein Zwei-Schritt-Mechanismus zugrunde liegt, konnte anhand von *in vitro* Prozessierungsstudien mit isolierten Halbproteasom-Vorläuferkomplexen nachgewiesen werden (Schmidtke *et al.*, 1996; Schmidtke *et al.*, 1997).

Für die autokatalytische Spaltung sind die als Konsensussequenz vorliegenden Aminosäuren Thr1, Thr2, Gly-1 und Lys33 (Groll *et al.*, 1999; Schmidtke *et al.*, 1996) essentiell. Durch Mutationsanalysen von $\beta 1i$ (Schmidtke *et al.*, 1996), $\beta 2i$ (Salzmann *et al.*, 1999) und $\beta 5i$ (Witt *et al.*, 2000) in Mammaliazellen, in denen die Aminosäure Thr-1 gegen Alanin ausgetauscht wurde, konnte gezeigt werden, dass zwar der Einbau der Untereinheiten in das 20S Proteasom nicht beeinflusst ist, aber nur eine unvollständige Prozessierung 8-10 Aminosäuren vor der eigentlichen Schnittstelle stattfindet. Diese Prozessierung wird wahrscheinlich von katalytisch aktiven Untereinheiten übernommen. Auffällig ist, dass die propeptidtragenden inaktiven Untereinheiten $\beta 6$ und $\beta 7$, denen das zweite Threonin in der Konsensussequenz fehlt, im *wt*-Proteasom ebenfalls 8-10 Aminosäuren vor der GT-Region von aktiven benachbarten β -Untereinheiten prozessiert werden (Groll *et al.*, 1999; Schmidtke *et al.*, 1996; Witt *et al.*, 2000). Ebenso konnten unvollständig prozessierte Propeptide bei umfangreichen Mutationsanalysen in katalytischen Untereinheiten in *S. cerevisiae* detektiert werden (Groll *et al.*, 1999).

4 Intrazelluläre Lokalisation von proteasomalen Komplexen

4.1 Zelluläre Verteilung des 20S Proteasoms

Das 20S Proteasom liegt im Cytoplasma, Zellkern und auf der cytoplasmatischen Seite des ER aller bisher untersuchten Mammaliazellen vor (Wojcik und DeMartino, 2003) und kann bis zu 1% des löslichen Proteins ausmachen (Tanaka *et al.*, 1986). Die Zusammensetzung und Verteilung von Proteasomen variiert jedoch sehr stark in unterschiedlichen Geweben und Zelllinien. Die Schwierigkeiten von Lokalisationsstudien entstehen vor allem durch begrenzte biochemische, immuncytochemische und immunhistochemische Methoden, durch die häufig widersprüchliche Aussagen zustande kommen. Des weiteren spielen Kulturbedingungen, Zusammensetzung der Proteasomen und wahrscheinlich auch die Assoziation mit verschiedenen Regulatoren und deren Lokalisation wiederum eine Rolle bei der Verteilung in den Zellen (Knecht und Rivett, 2000). Für den 19S und den 11S Regulator konnten ähnliche Lokalisationen wie für das 20S Proteasom beobachtet werden. Leider gibt es auch für diese Regulatoren keine einheitlichen Daten über die Quantität in den beiden Kompartimenten (Knecht und Rivett, 2000). Andere Regulatoren des 20S Proteasoms konnten Kompartimenten zugeordnet werden: PA200 wurde in den Zellkernen (Ustrell *et al.*, 2002) und der Proteasomeninhibitor PI31 am ER lokalisiert (Zaiss *et al.*, 2002).

Für Rattenhepatocyten wurde eine Quantifizierung der 20S Proteasomen in den einzelnen Kompartimenten vorgenommen. Demnach waren ca. 17 % in den Zellkernen, ca. 14 % mit dem ER assoziiert und der Rest cytoplasmatisch lokalisiert (Rivett *et al.*, 1992). Es gibt widersprüchliche Untersuchungen dazu, ob ein Teil der cytoplasmatischen Proteasomenfraktion an das Cytoskelett gebunden ist (Arcangeletti *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1994; Ryabova *et al.*, 1994). Reits *et al.* zeigten aber mittels „fluorescence recovery after photobleaching“ FRAP und einem β 1i-GFP Konstrukt, dass die meisten cytoplasmatischen und nukleären Proteasomen frei diffundieren können (Reits *et al.*, 1997). Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass Reits *et al.* eine markierte Immununtereinheit verwendeten und es sich demnach um eine spezielle Populationen von Proteasomen handelt (niemals um rein konstitutive) und dass eine relativ große Markierung wie GFP Interaktionen mit anderen Zellstrukturen stören könnte.

Dem mit dem ER assoziierten Teil der Proteasomenpopulation wird eine entscheidende Rolle während der „ER associated degradation“ (ERAD) zugeordnet. Dabei werden fehlgefaltete Proteine aus dem ER Lumen bzw. aus der ER Membran über einen retrograden Transport

dem Abbau durch das 20S Proteasom zugeführt (Brodsky und McCracken, 1999; Werner *et al.*, 1996). Im ER Lumen selbst sind keine Proteasomen zu finden. Bisher konnte nur eine durch den 19S Regulator vermittelte Bindung an den membranständigen Sec61 Komplex gezeigt werden (Kalies *et al.*, 2005), der für den retrograden Transport der Proteine verantwortlich sein könnte (Romisch, 1999). Eine andere Möglichkeit wäre die Assoziation mit oder nahe dem TAP Transporter (*transporter associated with antigen processing*). Dieser transportiert MHC Klasse I Epitope bzw. deren Vorläufer in das ER Lumen. Eine Nähe dieser beiden Komplexe würde den Transport effizienter machen (Brodsky und McCracken, 1999; Werner *et al.*, 1996). Für Immunoproteasomen, die eine für immunologisch relevante Epitope verbesserte Spaltpräferenzen aufweisen (van Hall *et al.*, 2000), konnte eine vermehrte Assoziation mit dem ER verglichen mit konstitutiven Proteasomen beobachtet werden (Brooks *et al.*, 2000b; Palmer *et al.*, 1996). Eine Coimmunpräzipitation von Immunoproteasomen und PA28 mit TAP Transportern ist jedoch nur einmal und wenig ausführlich publiziert worden (Hwang *et al.*, 2001).

Es wurden Assoziationen des 20S Proteasoms mit glattem ER und *cis*-Golgi nachgewiesen (Palmer *et al.*, 1996), während andere Arbeitsgruppen Proteasomen am glatten und rauen ER lokalisieren konnten (Liao *et al.*, 2003). Auch *in vitro* assoziieren 20S Proteasomen mit künstlich erzeugten Lipidmonolayern. Auf diesen Monolayern binden Proteasomen in einer aufrechten Lage, so dass sie mit einem α -Ring auf der Membran liegen (Newman *et al.*, 1996).

Die nukleären Proteasomen sparen die Bereiche der Nukleoli und mitotischer Chromosomen aus (Rivett *et al.*, 1992). Während der Mitose ordnen sich die Proteasomen verstärkt um die kondensierten Chromosomen an, in der Metaphase sind sie auch verstärkt an den Spindelpolen und während der Anaphase zwischen den auseinanderwandernden Chromosomen zu detektieren (Fricke, 2002; Wojcik *et al.*, 1995). Ansonsten sind Proteasomen während der Interphase über das gesamte Kernlumen verteilt. Der Kerntransport findet über die klassischen SV-40 NLS Sequenzen der α -Untereinheiten statt. Vier der sieben α -Untereinheiten haben zugängliche NLS (Groll *et al.*, 1997), die funktionell sind (Knuehl *et al.*, 1996; Mayr *et al.*, 1999; Nederlof *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997). Ein langsamer Transport in den Zellkern, allerdings kein Export, konnte für die oben beschriebene β 1i-GFP Variante in humanen Fibrosesarkom-Zellen beobachtet werden (Reits *et al.*, 1997). Ein Export konnte wiederum während der frühen Prophase beschrieben werden (Lafarga *et al.*, 2002).

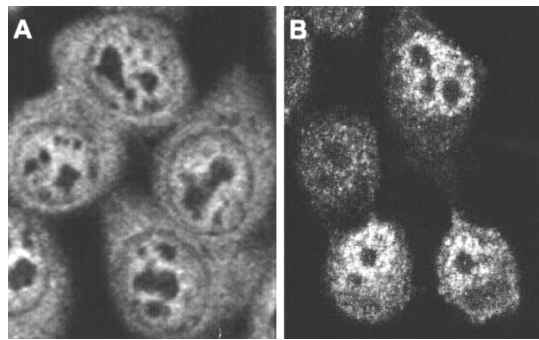


Abb. 8 Immunfluoreszenzaufnahmen von 20S Proteasomen (A) und 19S Regulatoren (B) in L132 Zellen (Brooks et al., 2000a).

In *S. cerevisiae* und *S. pombe* zeigt sich eine deutlich andere Lokalisation von 20S Proteasomen und 19S Regulatoren (Wendler et al., 2004). Beide Komplexe liegen in diesen Organismen angereichert am „*nuclear envelope*“ und ER Netzwerk der Zellen vor (Enenkel et al., 1998; Enenkel et al., 1999; Wilkinson et al., 1998). Auch in *S. cerevisiae* konnte der Kerntransport für Proteasomen und den 19S Regulator beschrieben werden (Lehmann et al., 2002; Wendler et al., 2004).

4.2 Lokalisation von Biogeneseintermediaten

Bisher wurde in den meisten Untersuchungen nicht zwischen reifen 20S Proteasomen und proteasomalen Vorläuferkomplexen unterschieden. Dabei erkennen die meisten Antikörper sowohl maturierte 20S Proteasomen als auch Assemblierungsintermediate. In *S. cerevisiae* konnten Vorläuferkomplexe durch eine GFP markierte UMP1p Version lokalisiert werden. Hauptsächlich wurden diese Vorläuferkomplexe am „*nuclear envelope*“ detektiert. Sie werden zur endgültigen Assemblierung und Maturierung über den klassischen Kerntransportweg durch Karyopherine in das Kernlumen transportiert. (Lehmann et al., 2002).

Lokalisationen proteasomaler Vorläuferkomplexe in Mammalia Zellen sind bisher nur für Immunoproteasomen beschrieben worden. Yang et al. (1995) führten Fraktionierungsexperimente durch und lokalisierten β 1i enthaltende Assemblierungsintermediate im Cytoplasma der Zellen. Für konstitutive Proteasomen in Säugerzellen liegen bisher keine Ergebnisse über eine Lokalisation der Assemblierung vor.

Zielstellung

Der Assemblierungsvorgang von 20S Proteasomen in Mammalia-Zellen ist bisher nur wenig verstanden und ein Großteil der Modelle beruht auf Ergebnissen aus prokaryotischen Organismen bzw. *S. cerevisiae*. Ein komplexer Vorgang, wie die Koordination 14 strukturell sehr ähnlicher, aber verschiedener Untereinheiten an die richtigen Positionen, bedarf aber eines wohlorganisierten und regulierten Prozesses, für dessen Entschlüsselung die weniger komplexen Vorgänge in Prokaryoten und Hefen nur als Anhaltspunkte dienen dürfen. Daher war eine genaue Analyse des Assemblierungsvorgangs in humanen Zellen Zielstellung dieser Arbeit. Hierfür sollte ein *in vitro* Systems etabliert werden, das den Assemblierungsprozess humaner Untereinheiten simuliert, wodurch noch unbekannte Assemblierungsintermediate identifiziert werden sollten. Auf diesen Ergebnissen aufbauend war eine Bestätigung dieser Komplexe *in vivo* durch Experimente mit radioaktiv markierten HeLa Zellextrakten vorgesehen. Komplexe Assemblierungsvorgänge bedürfen häufig einer subzellulären Lokalisation. Daher war ein weiterer Schwerpunkt die Lokalisation von proteasomalen Assemblierungsintermediaten durch immuncytochemische und biochemische Methoden in humanen Zellen. Diese Arbeit soll zum weiteren Verständnis des überaus komplexen Assemblierungsprozesses konstitutiver humaner 20S Proteasomen beitragen.

Material und Methoden

5 Geräte

Mini Extruder	Avanti Polar Lipids, Alabaster
Phosphoimager FLA3000 Fujifilm mit Software AIDA	Raytest, Straubenhardt
Scintillation Counter „Wallace 1410“	Pharmacia, Freiberg
Thermocycler Uno Thermoblock	Biometra, Göttingen
Tisch-Ultrazentrifuge; Beckmann TL-100	Beckmann Coulter, Krefeld
Ultralight Microscope Leica DMLFSA	Leica, Jena
Ultrazentrifuge Beckman L-70	Beckmann Coulter, Krefeld

6 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

6.1 Chemikalien und Proteine

Ampholine	GE Healthcare, München
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Canine Mircrosomal Membranes	Roche, Mannheim
Cholesterol	Sigma, Taufkirchen
Complete Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Complete Protease-Inhibitor-Cocktail EDTA free	Roche, Mannheim
DNA 1Kb Marker	New England Biolabs, Frankfurt
dNTP-Mix	Peqlab, Erlangen
Fugene 6-Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
humanes Interferon γ (rekombinant)	Roche, Mannheim
MG132 Proteasomeninhibitor	Calbiochem, Schwalbach
Pharmalyte	GE Healthcare, München
Phospholipid Mixture for HPLC from Soybean	Supelco, Bellefonte
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt

RNasin RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim
Servalyte	Serva; Heidelberg
Trans ³⁵ S-Label Metabolic Labeling Reagent	MP Biomedicals (ICN), Eschwege

6.2 Kits

ECL Plus Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare, München
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
GFX TM PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
High Molecular Weight Calibration Kit for Native Electrophoresis	GE Healthcare, München
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
Proteo Extract TM Native Membrane Protein Extraction Kit	Calbiochem, Schwalbach
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Tnt T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim
Topo TA cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

6.3 Enzyme

DNA Polymerase I, <i>Large</i> (Klenow) Fragment	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt
Reverse Transkriptase M-MuLV 'USB'	GE Healthcare, München
RNase A	Sigma, Taufkirchen
SAP (Shrimp Alkalische Phosphatase)	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt

6.4 Verbrauchsmaterialien

Immobilon-P (PVDF-Membran, 0,45µM)	Millipore, Schwalbach
Kodak Scientific Imaging Film X-OMAT UV	PMA Bode, Berlin
Kodak BIOMAX Filme	GE Healthcare, München
PC Membran	Avanti Polar Lipids, Alabaster
Protein A Sepharose CL-4B	GE Healthcare, München
Protein G Agarose	Roche, Mannheim

7 Oligonukleotide und Plasmide

pRSETA	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1/Zeo (+/-)	Invitrogen, Karlsruhe
pIVEX2.3	Roche, Mannheim
pSG5	Stratagene, Heidelberg

7.1 Nucleotidsequenzen

Tab. 1 NCBI Sequenzen klonierter Konstrukte

Bezeichnung	NCBI Nucleotidsequenz
$\alpha 1$	NM_002791
$\alpha 2$	NM_002787
$\alpha 3$	NM_002789
$\alpha 4$	NM_002792
$\alpha 5$	NM_002790
$\alpha 6$	NM_002786
$\alpha 7$	NM_002788
$\beta 1$	NM_02798
$\beta 2$	NM_02799
$\beta 3$	NM_02795
$\beta 4$	NM_02794
$\beta 5$	NM_02797
$\beta 6$	NM_02793
$\beta 7$	NM_02796

POMP	AF125097
Pac1	NM_003720
Pac2	NM_020232

7.2 Oligonucleotide

Tab. 2 Zur Amplifikation in der PCR eingesetzte Primer

Bezeichnung	forward Primer	reverse Primer
$\alpha 1$	GGA ATT CCA TAT GTC CCG TGG CAG CGC	GCC CTA GGT TAG TCT CTC TCT GCT GCA A
$\alpha 2$	GGA ATT CCA TAT GGC GGA CGG GTA CAG	GCC CTA GGT TAT GCT ATG GCA GCC TAA TC
$\alpha 3$	GGA ATT CCA TAT GTC TCG ATA TGA CTC	GCC CTA GGC TAT TTA TCC TTT TCT TGT
$\alpha 4$	GGA ATT CCA TAT GAG CTA CCG CGC CAT	CGG GAT CCT CAT GAT GCT TTC TTT TTC TTC
$\alpha 5$	AAG GAA AAA AGC GGC CGC TTT CTT ACC CGG TCT GAG	GGA ATT CTT AAA TGT CCT TGA TAA CTT C
$\alpha 6$	AAG GAA AAA AGC GGC CGC TTT CGA AAT CAG TAT GAC	GGA ATT CTT ACA TAT TTG ATA ATA ATA T
$\alpha 7$	GGA ATT CCA TAT GAG CTC CGG CAC TGG	CGG GAT CCT TAC ATA TTA TCA TCA GAT TC
$\beta 1$	AAG GAA AAA AGC GGC CGC GCG GCT ACC TTA CTA GC	CGC GGA TCC GCA TGG CGG CTA CCT TAG
$\beta 2$	AAG GAA AAA AGC GGC CGC GCG GCT GTG TCG GTG TA	CGC GGA TCC GCA TGG CGG CTG TGT TGT A
$\beta 3$	AAG GAA AAA AGC GGC CGC TCT ATT ATG TCC TAT AA	TCC CCC CGG GGA TGT CTA TTA TGT ATA A
$\beta 4$	AAG GAA AAA AGC GGC CGC GAG TAC CTC ATC GGT AT	CGC GGA TCC GCA TGG AGT ACC TCA GTA T
$\beta 5$	AAG GAA AAA AGC GGC CGC TCT ATT ATG TCC TAT AA	TCC CCC CGG GGA TGT CTA TTA TGT ATA A
$\beta 6$	AAG GAA AAA AGC GGC CGC TTG TCC TCT ACA GCC AT	CGC GGA TCC GCA TGT TGT CCT CTA CCA T
$\beta 7$	AAG GAA AAA AGC GGC CGC GAA GCG TTT TTG GGG TC	TCC CCC CGG GGA TGG AAG CGT TTT GGT C
N-term POMP	GGA ATT CCA TAT GAA TGC AGG ACT TGG ATC T	CCC AAG CTT GAA TTC CAT CTG TAA TAG CGG
C-term POMP	GGA ATT CCA TAT GGA ATT GGC AGT GCA G	CCC AAG CTT TTA CAG TAA ACC AAG ATA TTC CTC

Pac1	GGA ATT CCA TAT GGC GGC GTT CTT CGG A	CGG GAT CCT CAT GTA TAA ATG TTA TGA ATC TC
Pac2	GGA ATT CAT GTT CGT TCC CGT GGA G	CGG GAT CCT CAG AAA AGT GCA GGA AGA C

7.3 Konstrukte

Tab. 3 Konstrukte und Schnittstellen

Konstrukt- bezeichnung	Insert	Klonierungsschnittstellen	Plasmid	Bemerkungen
$\alpha 1$	$\alpha 1$	NdeI / BamHI	pRSETA	
$\alpha 2$	$\alpha 2$	NdeI / BamHI	pRSETA	
$\alpha 3$	$\alpha 3$	NdeI / BamHI	pRSETA	
$\alpha 4$	$\alpha 4$	NdeI / BamHI	pRSETA	
$\alpha 5$	$\alpha 5$	NotI / EcoRI (blunt)	pZeo	
$\alpha 6$	$\alpha 6$	NotI / EcoRI (blunt)	pZeo	
$\alpha 7$	$\alpha 7$	NdeI / BamHI	pRSETA	
$\beta 1$	$\beta 1$	NotI / BamHI	pIVEX2.3	S. Heink
$\beta 2$	$\beta 2$	NotI / BamHI	pIVEX2.3	S. Heink
$\beta 3$	$\beta 3$	NotI / XmaI (blunt)	pIVEX2.3	S. Heink
$\beta 4$	$\beta 4$	NotI / BamHI	pIVEX2.3	S. Heink
$\beta 5$	$\beta 5$	NotI / XmaI (blunt)	pIVEX2.3	S. Heink
$\beta 6$	$\beta 6$	NotI / BamHI	pIVEX2.3	S. Heink
$\beta 7$	$\beta 7$	NotI / XmaI (blunt)	pIVEX2.3	S. Heink
POMP	POMP	NdeI / BamHI	pRSETA	E. Witt
N-term POMP	83 AA N-terminal	NdeI / HindIII	pRSETA	
C-term POMP	61AA C-terminal	NdeI / HindIII (blunt)	pRSETA	
Pac1	Pac1	NdeI / BamHI	pRSETA	
Pac2	Pac2	EcoRI / BamHI	pSG5	

8 Antikörper

Tab. 4 Verdünnungen und Einsatz von Antikörpern

Antikörper	Spezifisch	Spezies (mAK/pAK)	Verdünnung WB/IF/IP	Herkunft
Calnexin	Calnexin	Maus mAK	1 : 15 000 / 1 : 50 / -	BD Biosciences cl37
$\beta 1$	$\beta 1$	Kaninchen pAK	1 : 4 000 / - / -	Schmidtke LS
$\beta 2$	$\beta 2$	Maus mAK	1 : 2 000 / - / -	Hendil <i>et al.</i> , 1995
$\beta 5$	$\beta 5$	Kaninchen pAK	1 : 5 000 / - / -	Kopp <i>et al.</i> , 1997
LMP2	$\beta 1i$	Kaninchen pAK	- / 1 : 100 / -	Aki <i>et al.</i> , 1994
LMP7	$\beta 5i$	Kaninchen pAK	- / 1 : 100 / -	Aki <i>et al.</i> , 1994
MCP20	$\alpha 6$	Maus mAK	- / - / ja	Hendil <i>et al.</i> , 1995
N3	$\beta 7$	Maus mAK	- / - / ja	Hendil <i>et al.</i> , 1995
POMP	POMP	Kaninchen pAK	1 : 1 000 / 1 : 50 / ja	Witt <i>et al.</i> , 2000
Pre20S	Pre $\alpha 7$	Kaninchen pAK	- / 1 : 100 / ja	Nandi <i>et al.</i> , 1997

WB: Western Blot; IF: indirekte Immunfluoreszenz; IP: Immunpräzipitation

9 Zellkultur

9.1 Kultur humaner Zelllinien (HeLa und CRL2429) und IFN γ Stimulation

BASAL ISCOVE's Medium supplementiert mit 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 % FCS

Einfriermedium: BASAL ISCOVE's Medium supplementiert mit 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 20 % FCS; 10 % DMSO

10 x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2 g KH₂PO₄, ad 1 l H₂O, pH 6,63 mit HCl einstellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturschalen bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Begasungsbrutschränken (Heraeus, Hanau). Die Ablösung der adhärennten Zellen erfolgte nach einmaligen Waschen mit 1 x PBS durch Trypsin/EDTA (Gibco Invitrogen). Die Zellsuspension wurde 1:10 mit Vollmedium verdünnt und bei ~ 1 000 g, 5 min und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und die Zellen 1:3 - 1:10 verdünnt ausgesät.

Zur Dauerkultur wurden 1 x 10⁶ in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in einer mit Isopropanol

gefüllten Kryobox auf -80°C heruntergekühlt und nach 1-2 Tagen in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen erfolgte durch 1:10 Verdünnung in Vollmedium, Abzentrifugation bei ~1 000 g, 5 min und 4°C, Resuspension in Vollmedium und Aussaat auf einer Kulturschale mit 10 cm Durchmesser.

Eine Induktion der Immunoproteasomen erfolgte durch Zugabe von 150 units / ml Medium IFN γ für 24 h.

9.2 Radioaktive Markierung von Hela Zellen mit ^{35}S

Methionin-freies Medium: RPMI (methioninfrei) supplementiert mit 1% L-Glutamin und 1% dialysiertem FCS (Biochrom)

Hela Zellen wurden auf 6 cm Kulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 70-80 % mit Methionin freiem RPMI Medium inkubiert. Nach 30 min wurden 0,2 mCi Trans ^{35}S -Label (ICN) / ml Medium zugegeben und für unterschiedlich lange Zeiträume inkubiert. Die Zellen wurden nach erfolgter Markierung 2 mal mit PBS gewaschen und durch Ablösen mit Trypsin geerntet.

9.3 Liposomale Transfektion von POMP siRNA

Durchgeführt von Daniela Ludwig und beschrieben in Heink *et al.* (2005).

10 Molekularbiologische Methoden

10.1 RT PCR

Prä-Mix: 2 μl RNA + 1 μl Oligo(dT)-Primer (50 μM), 17 μl DEPC-H $_2\text{O}$

Reaktionsmix: 1 μl M-MuLV Reverse Transkriptase, 5 μl zugehöriger *First Strand Buffer* (5x), 1 μl RNase Inhibitor (*RNasin*), 1 μl 25mM dNTP-Mix

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde aus HeLa Zellen mittels des *High Pure RNA Isolation Kit* laut Herstellerangaben durchgeführt. Durch eine Inkubation des Prä-Mixes im Thermocycler wurde die mRNA für 10 min bei 65°C denaturiert. Daraufhin erfolgte eine Anlagerung der Oligo-dT Primer bei 4°C für 2 min. Nach Zugabe des Reaktionsmixes erfolgte die Umschreibung in cDNA bei 42°C für 1h. Die Reverse Transkriptase wurde durch Erhitzen auf 95°C für 2 min denaturiert.

10.2 DNA-Amplifikation mittels PCR

PCR-Ansatz (50 μl): 5 μl *High Fidelity* 10 x PCR-Puffer mit MgCl $_2$; 0,5 μl fw und re Primer (Stammlsg.: 50 μM); 1 μl dNTP-Mix (Stammlsg.: 10 mM je dNTP); 0,5 μl Template 0,5 μl ; *High Fidelity* DNA-Polymerase Gemisch; 42 μl H $_2\text{O}$

Die Amplifikationen der proteasomalen Untereinheiten bzw. der Assemblierungsfaktoren oder

verkürzten Konstrukten erfolgten zur Klonierung in geeignete Expressionsvektoren. Als Template dienten entsprechende Sequenzen enthaltende Vektoren von E. Krüger bzw. S. Apcher und cDNA aus HeLa Zellen. Verwendete Primer mit Schnittsequenzen für spezifische Restriktionsendonukleasen sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 5 Standard PCR Schema

Anzahl der Zyklen	Segment	Temperatur (°C)	Dauer
1	Denaturierung	94	5 min
30	Denaturierung	94	1 min
	Annealing	55	1 min
	Elongation	72	1 min
1	End-Elongation	72	10 min

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt (s. Kap. 10.3) und die anhand des Größenstandards identifizierten Banden ausgeschnitten und über den *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (s. Kap. 10.4) extrahiert.

10.3 Analytische und Präparative Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer: 40 mM Tris / HCl, 19 mM Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0

6 x DNA-Probenpuffer: 250 mg Xylencyanol, 250 mg Bromphenolblau, 15 g Ficoll 400 auf 100 ml H₂O

Die das jeweilige PCR-Produkt enthaltende Probe wurde 6:1 mit Probenpuffer versetzt, auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei max. 100 V in TAE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Eine Färbung der Banden erfolgte mit Ethidiumbromid (Sambrook *et al.*, 1989)

Als Größenstandard diente eine 1 kb DNA-Leiter.

10.4 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Gelbanden und wässrigen Lösungen

Die Reinigung erfolgte über den *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* nach Herstellerangaben. Alle DNA Fragmente und Vektoren wurden in sterilem MilliQ aufbewahrt.

10.5 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von Plasmiden und Fragmenten erfolgte mit Restriktionsendonukleasen und Puffern von NEB. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze erfolgte nach Herstellerangaben. Verwendete Restriktionsenzyme sind in Tab. 3 aufgeführt.

10.6 Dephosphorylierung eines DNA-Vektors

Die linearisierten Vektoren wurden aus 1%igen Agarosegelen ausgeschnitten und über den *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* gereinigt. Die 5'-Dephosphorylierung der Plasmide erfolgte im entsprechenden Restriktionspuffer von NEB. Es wurden im Abstand von 30 min 2 mal 0,5 µl alkalischer Shrimp-Phosphatase dem Reaktionsansatz zugegeben und bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde durch Erhitzen auf 65°C für 10 min denaturiert.

10.7 Klenow Auffüllreaktion

Reaktionsansatz (20 µl): 1,5 µg DNA; 1 U Klenow-Polymerase; 2 µl 10x Reaktionspuffer; 1 µl dNTP-Mix (10 mM); (1 µl Polynucleotidkinase zum Fragment) ad 20 µl H₂O

Für eine Klonierung mit „blunt“-Enden (siehe Tab. 3) wurden 5'-Überhänge mittels einer Klenow-fill-in Reaktion aufgefüllt. Dazu wurden Fragmente und Vektoren im Reaktionsansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Inaktivierung der Klenow-Polymerase erfolgte mit Zugabe von 0,5 µl EDTA pH 8,0. Für anschließende Verdauung wurden die Fragmente und Vektoren über den *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* gereinigt.

10.8 Ligation

Die DNA-Fragmente wurden in einem Verhältnis von 3:1 zum Vektor eingesetzt. Die Ligation erfolgte in Ligationspuffer in einem Gesamtansatz von 20 µl durch Zugabe von 200 Einheiten T4-DNA Ligase ü. N. bei Raumtemperatur.

10.9 Plasmidpräparationen

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte mit dem *Qiagen Plasmid Mini Kit* und dem *Qiagen Plasmid Maxi Kit* nach den Angaben des Herstellers.

10.10 Bestimmung der DNA Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm im Photometer bestimmt. Die Konzentration doppelsträngiger DNA wurde nach folgender Formel bestimmt: $c_{\text{DNA}} (\mu\text{g/ml}) = 50 \times \text{OD}_{\lambda=260 \text{ nm}}$.

10.11 Sequenzierung der Plasmide

Die Sequenzierung wurde von der AGOWA GmbH Berlin durchgeführt.

10.12 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

ψ a-Medium: 0,5 % Hefe-Extrakt; 2 % Bacto-Trypton, 40 mM MgSO₄, pH 7,6

TFB I: 30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8

TFB II: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin

Zentrifugationsschritte: 1 000 g, 4°C, 10 min

Das ψ a-Medium und die Lösung TFB II wurden autoklaviert, während TFB I steril filtriert wurde.

Eine Vorkultur mit 2 ml ψ a-Medium wurde mit *E. coli* DH5 α von einer ψ a-Agarplatte angeimpft und ü. N. bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die 2 ml Vorkultur wurde am nächsten Tag auf 100 ml ψ a-Medium gegeben und die Kultur bis zu einer OD _{$\lambda=550$} von 0,5 bei 37°C auf dem Schüttler herangezogen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 ml eiskaltem TFB I vorsichtig resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert, wiederum abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml eiskaltem TFB II resuspendiert. Auf Eis wurden 50 μ l Aliquots abgenommen und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Nach 15 min Inkubation wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

10.13 Transformation von *E. coli* DH5 α

LB-Medium: 0,5 % Hefe-Extrakt, 1 % Bacto-Trypton, 100 mM NaCl

LB-Agar: LB-Medium + 2 % Bacto-Agar

Ampicillinkonzentration bei Selektionsbedingungen: 100 μ g/ml

Das Medium und der Agar wurden autoklaviert. Die Stammlösung des Ampicillins (100 mg /ml) wurde steril filtriert.

Ein 50 μ l Aliquot kompetenter *E. coli* DH5 α Zellen wurde 10 min auf Eis aufgetaut und 20 μ l Ligationsansatz zu den kompetenten Zellen gegeben, vorsichtig durchmischt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen für 90 Sekunden auf 42°C erwärmt (Hitzeschock) und wieder 2 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde mit 900 μ l LB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Es wurden einmal 200 μ l des Ansatzes und einmal der gesamte Rest auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert.

11 Proteinbiochemische Methoden

11.1 Gewinnung von Gesamtproteinzelllysaten aus Mammaliazellen

Lysepuffer: 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 % Triton-X 100, MG132 (10 µM)

Die Zellen wurde 1 mal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Medium abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde 1 mal mit PBS gewaschen und in ~50 µl Lysepuffer / 1 x 10⁶ Zellen aufgenommen. Dann wurden die Zellen 3 mal in Stickstoff schockgefroren und jeweils bei 20°C wieder aufgetaut. Die Probe wurde bei 17 500 g, 15 min und 4°C abzentrifugiert und der Überstand als Gesamtzelllysat weiterverwendet. Bei der Herstellung von Gesamtzelllysaten aus radioaktiv markierten Zellen wurden je 10 µl des Lysats im Scintillations-Counter gemessen, um die Menge der eingebauten Radioaktivität zu überprüfen.

11.2 TCA/NaDoc Proteinpräzipitation

Die Proben wurden mit 0,01 % NaDoc (EK) 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurde TCA bis zu einer Endkonzentration von 10 % zugegeben und erneut 20 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden bei 17 500 g, 15 min bei 4°C abzentrifugiert und 2 mal mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen, zum Schluss getrocknet und in 1 x SDS-Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen.

11.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)

4 x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris HCl, pH 8,8

4 x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris HCl, pH 6,8

6 x SDS-Probenpuffer: 375 mM Tris HCl (pH 6,8), 1 % SDS (w/v), 30 % (v/v) Glycerin, 0,5 M DTT, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris HCl, 200 mM Glycin, 1 % SDS (w/v), pH 8,3-8,5

Acrylamid-Stammlösung: 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid

Zusammensetzung von 5 x 0,75 mm Minigelen für das Midget-System von Hoefer:

Trenngel (15 %): 12 ml Acrylamidlg., 6 ml Trenngelpuffer, 6 ml H₂O, 162 µl APS, 15 µl TEMED

Sammelgel: 3 ml Acrylamidlg., 5 ml Sammelgelpuffer, 7 ml H₂O, 200 µl APS, 20 µl TEMED

Die Proben bzw. die Protein A/G-Sepharose aus Immunopräzipitationen wurden in 1 x Probenpuffer 5

min bei 99°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Während der Elektrophorese wurde bei Durchlaufen der Proben durch das Sammelgel eine Spannung von 15 mA konst. und während des Durchlaufens des Trennegels eine Spannung von 30 mA konst. pro Gel angelegt.

Zur Orientierung während der Elektrophorese und zur späteren Einordnung der Molekulargewichte wurden 5 µl des *Prestained Protein Marker* von NEB aufgetragen.

11.4 Western Blot Analyse und Immunodetektion

Transfer-Puffer: SDS-Laufpuffer (s. Kap. 11.3) mit 20 % Methanol

TBS-T: 50 mM Tris HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1 % TWEEN-20

Blocklösung: TBST mit 2,5 % Magermilchpulver und 462 µM NaN₃

Amidoschwarzlösung: 0,1 % Amidoschwarz, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure

Die aufgetrennten Proteine wurden durch einen Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und mittels Antikörperrnachweis identifiziert. Der Western Blot wurde nach dem Semy-Dry Verfahren durchgeführt. Dazu wurde die Membran mit 100 % Methanol aktiviert und das Gel und die Membran wurden zwischen je 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier in die Semy-Dry Apparatur mit der Membranseite zur Anode gelegt. Es wurde eine Spannung von 400 mA für 1 h angelegt. Daraufhin wurde zum Nachweis der Proteinübertragung die Membran mit Amidoblacklösung angefärbt und mit Wasser wieder entfärbt. Überschüssigen Proteinbindestellen der Membran wurden mit Blocklösung für 1 h bei RT abgesättigt. Die Inkubation im primären Antikörper (verwendete Antikörper s. Tab. 4) wurde ü. N. bei 4°C in Blocklösung durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Membran 2 mal 20 min mit TBS-T gewaschen, für 1 h im sekundären Antikörper inkubiert (s. Tab. 5), erneut 2 mal 20 min mit TBS-T und zum Schluss 2 mal kurz mit Aqua. bidest gewaschen. Die Detektion der Antikörperreaktion wurde mit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* durchgeführt und auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Tab. 5 In den Western Blot Analysen verwendete Sekundärantikörper

Gerichtet gegen	Herkunft	Verdünnung	Kopplung	Hersteller
Kaninchen	Ziege	1 : 1 0000	Peroxidase	Dianova
Maus	Schaf	1 : 5 000	Peroxidase	Seramun

11.5 Trocknen von Gelen mit radioaktiv markierten Proteinen und Detektion

Fixierer: 40 % Methanol, 10 % Eisessig in H₂O

Zur Fixierung der Proteine in den SDS-Gelen wurden diese für 10 min bei Raumtemperatur in Fixierer auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurden die Gele in einer 10%igen Glycerollösung kurz geschwenkt und auf ein Whatman-Papier überführt. Das Gel wurde mit Saran-Folie abgedeckt und in einem Gel Trockner für 2 h bei 80°C und angelegtem Vakuum getrocknet.

Bei der Detektion über den Phosphorimager wurden die Gele auf einer *Imaging Plate for Bio Imaging Analyzer* (BAS-MS, Fujifilm) exponiert und die Signale im IP-Modus des Phosphorimagers ausgelesen. Alternativ erfolgte eine Detektion nach Exponierung des Gels auf einem *Biomax*-Film bei -80°C und anschließender Entwicklung im Fotolabor. Densitometrische Auswertungen erfolgten über das Programm *AIDA*.

11.6 Ethanol Fällungen und 2D-Gelelektrophorese

NEpHGE Gele: 5,48 g Harnstoff; 1,32 Acrylamid-Mix; 2 ml NP-40 (10 %); 0,125 ml Ampholyte-Mix; 20 µl APS 10 %; 3 µl TEMED

NEpHGE Kathodenpuffer: 0,02 M NaOH in MilliQ

NEpHGE Anodenpuffer: 0,01 M H₃PO₄ in MilliQ

2D-Probenpuffer: Harnstoff 0,57 g 200 µl 10 % NP-40; 50 µl β-Mercaptoethanol; Ampholyte-Mix 125 µl; 15 µl 20 % SDS

2D-Overlaypuffer: 0,54 g Harnstoff; 25 µl Ampholyte-Mix

Acrylamid-Mix: 28,38 % Acrylamid; 1,62 % Bisacrylamid

Ampholyte-Mix: 125 µl Servalyte pH 2,0 – 11,0; 125 µl Ampholine pH 3,5 – 10,0; 125 µl Ampholine pH 7,0 – 9,0 ; 375 µl Pharmalyte pH 4,0 – 6,5; 375 µl Pharmalyte 5,0 – 8,0

Äquilibriumspuffer: 5 ml Glycerol; 0,54 g DTT; 5,8 ml 20 % SDS; 3,1 ml Tris HCl pH 6,8 (1M) ad 50 ml MilliQ

Einbettagarose: 0,25g Agarose; 2,5 ml Glycerol; 1,6 ml Tris HCl 6,8 (1M); 2,9 ml 20 % SDS ad 20 ml H₂O

Es wurden 2D-Gelelektrophoresen von radioaktiv markierten 20S Proteasomen und Assemblierungsintermediaten durchgeführt. Um radioaktiv markierte Untereinheiten identifizieren zu können wurde 60 µg gereinigtes humanes Erythrozytenproteasom (von Ilse Drung zur Verfügung gestellt) durch Zugabe der 2,5 fachen Menge Ethanol für 1h bei -80°C präzipitiert, 1 h bei 4°C und 17 500 g abzentrifugiert und an der Luft getrocknet. Das Präzipitat wurde ü. N. in Probenpuffer bei 30°C gelöst und bei jeder 2D-Gelelektrophorese der Probe zugefügt. Die Proben der radioaktiv markierten und immunpräzipitierten Komplexe bzw. Untereinheiten wurden durch Inkubation der Sepharose-*beads* mit NEpHGE Probenpuffer ü. N. bei leichtem schwenken von den *beads* gelöst.

Die NEpHGE Gele wurden in dünnen Glasröhrchen gegossen und mit Overlaypuffer überschichtet, um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten und das Austrocknen ü. N. zu verhindern. Vor dem Auftragen der Probe wurden die Gele 2 mal mit MilliQ gewaschen. Die Proben wurden auf die NEpGHE Gele geladen, mit Overlaypuffer überschichtet und für 4 h bei 400 V und für eine weitere Stunde bei 800 V aufgetrennt. Die Gele wurden 3 x 15 min in Äquilibrationpuffer geschwenkt. Die äquilibrierten Gele wurden auf ein SDS-Gel überführt und durch erwärmte Einbettagarose auf der oberen Gelkante luftblasenfrei fixiert. Die Auftrennung in den SDS-Gelen erfolgte für 1200 Vh.

Die Untereinheiten des 20S Proteasoms aus Erythrozyten konnten durch eine Coomassie-Färbung (s. Kap. 11.8) sichtbar gemacht werden. Daraufhin wurde das Gel getrocknet und eine Autoradiographie durchgeführt (s. Kap. 11.5). Die Anordnung der Spots von gereinigtem humanen 20S Proteasom in der 2D-Gelelektrophorese sind bekannt. Dadurch konnte durch eine Zuordnung der radioaktiven Spots zu Coomassie gefärbten Spots eine Identifizierung radioaktiv markierter Untereinheiten durchgeführt werden. Die Proformen der β -Untereinheiten konnten über ihr Molekulargewicht, isoelektrischen Punkt und einem Vergleich des Laufverhaltens im 2D-Gel nach Expression im Retikulozytenlysat identifiziert werden.

11.7 Gradienten-Nativgelelektrophorese

Nativ-Probenpuffer: H₂O Bromphenolblau gesättigt

5 x Laufpuffer: 0,45 M Tris HCl pH8,1-8,4; 0,45 M Borat; 10 mM MgCl₂

3,5 % Acrylamidgel: 3,67 ml H₂O; 1,1 ml 5 X Laufpuffer; 0,641 ml Acrylamid-Mix; 5,5 μ l DTT (1M); 27 μ l APS (10 %); 2,7 μ l TEMED

8 % Acrylamidgel: 1,38 ml H₂O; 1,1 ml 5 X Laufpuffer; 1,46 ml Acrylamid-Mix; 1,5 ml Glycerol; 5,5 μ l DTT (1M); 27 μ l APS (10 %); 2,7 μ l TEMED

Es wurden je 3,5 ml der Acrylamidlösungen in einen Gradientenmischer gegeben und mit Hilfe einer Kanüle zwischen die Glasplatten einer Biorad Elektrophoresekommer geschichtet. Die Proben wurden mit Nativprobenpuffer versetzt und aufgetragen. Zur Orientierung wurde ein Größenmarker (*High Molecular Weight Calibration Kit for Native Electrophoresis*) mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 1350 Vh bei 4°C ausgeführt, die Gele mit Coomassie gefärbt (s. Kap. 11.8) und die Radioaktivität autoradiographisch analysiert (s. Kap. 11.5).

11.8 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Coomassie-Lösung: 0,1 w/v Coomassie Brilliant blue R250, 10 % Essigsäure, 30 % Methanol

Entfärber: 40 % Methanol, 10 % Essigsäure in H₂O

Die Gele der SDS- oder Nativgelelektrophorese wurden in Coomassie-Lösung 1 h bei RT vorsichtig geschwenkt. Die Gele wurden mit Entfärber so lange inkubiert, bis die Banden bzw. Spots gut zu erkennen waren und der Hintergrund weitgehend farblos war.

11.9 Saccharosegradienten Zentrifugation

Gradientenpuffer: 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

Es wurden Gradienten im SW 40-Ultrazentrifugenröhrchen mit einer Saccharosekonzentration von 40 % - 10 % gegossen und ca. 4 mg Protein aus Gesamtproteinlysaten bzw. die Ansätze der *in vitro* Expressionsexperimente (s. Kap. 11.11) aufgetragen. Es wurde 16 h bei 4°C und 40 000 rpm im SW 40 Rotor zentrifugiert und der Gradient von oben in 500 µl Schritten fraktioniert.

11.10 Immunpräzipitation von Proteinen

Puffer A: 10 mM Hepes pH 7,2; 200 mM KAc; (5 mM MgAc₂; 5 mM MgCl₂) ; Proteaseinhibitor-Cocktail EDTA frei, 10 µM MG132

Puffer B: 10 mM Hepes pH 7,2; 80 mM KAc; (5 mM MgAc₂; 5 mM MgCl₂) ; Proteaseinhibitor-Cocktail EDTA frei, 10 µM MG132

Protein A / G-Suspension: 1 : 1 Puffer / Sepharose (4 : 1 / Sepharose A : Sepharose G)

Für die Herstellung der Protein A / G-Suspension wurde die Protein A Sepharose in PBS gequollen und 3:1 mit vorgequollener Protein G Sepharose vermischt. Die Suspension wurde dreimal mit PBS gewaschen und für 2 h mit 50 µg / ml BSA bei 4°C auf dem Rad inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Die Immunpräzipitationen wurden aus den Saccharosegradientenfraktionen, die α-Ringe bzw. 13S Vorläuferkomplexe enthalten, oder aus Gesamtzelllysaten durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit 1fach PBS verdünnt und mit 20 µg / ml BSA für 10 min auf dem Rad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 2-8 µl Antikörper dazugegeben (verwendete Antikörper siehe Tab. 4) und die Probe aufgrund der Labilität von Vorläuferkomplexen für 2 h bei 4°C auf dem Rad inkubiert. Nach Zugabe von 60 µl Protein A / G-Suspension (ca. 30 µl Bead-Pellet) wurden die Proben eine weitere Stunde bei 4°C auf dem Rad inkubiert und gewaschen. Standardmäßig wurden Immunpräzipitationen mit 1 ml 2fach PBS + 0,5 % NP-40 (2x), mit 1fach PBS (2x) und mit MilliQ (1x) gewaschen. Die Immunpräzipitationen der Vorläuferkomplexe mit und ohne Magnesium-Ionen wurden mit Puffer A

(2x), Puffer B (3x) je mit oder ohne Magnesiumzugabe gewaschen. Die Puffer ohne Magnesium wurden zusätzlich mit 5 mM EDTA versetzt. Für die Identifizierung eines möglichen Membranankers wurden die Immunpräzipitationen mit magnesiumhaltigen Puffern A und B wie zuvor angegeben gewaschen. Überschüssiges Wasser wurde immer mit einer Kanüle abgenommen, so dass die *beads* in 1 x Probenpuffer (für SDS-PAGE oder 2D-Gelelektrophorese) aufgenommen werden konnten.

11.11 *In vitro* Expression im Retikulozytenlysat und “pull down” mit Mikrosomen

Die *in vitro* Expression im Retikulozytenlysat wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei der gleichzeitigen Translation mehrerer Untereinheiten wurden 200 µl Ansätze mit 0,5 µg jeder DNA versetzt.

Falls nicht anders angegeben wurden die Ansätze mit 2 µl Mikrosomen inkubiert. Die Mikrosomen wurden durch ein 0,5 M Saccharosekissen in PBS bei 17 500 g und 4°C abzentrifugiert und 2 mal mit PBS gewaschen, während Liposomen nur gewaschen wurden. Für die Untersuchung einer posttranslationalen Assoziation wurden die Membranen erst nach erfolgter Expression und darauf folgender fünfminütiger Inkubation der Probe mit 0,4 mg / ml Cycloheximid zugegeben. Um die Membranassoziation von POMP weiter zu charakterisieren, wurden die Mikrosomen vor der Zentrifugation durch das Saccharosekissen mit 2,5 M Harnstoff in PBS bzw. Na₂CO₃ in PBS pH 11 für 10 min inkubiert.

Um Komplexe aus den Saccharosegradienten nach erfolgter *in vitro* Translation an Mikrosomen zu binden, wurden die Saccharosefraktionen mit PBS verdünnt und für 2 h bei 4°C auf dem Rad mit 5 µl Mikrosomen inkubiert. Die Mikrosomen wurden abzentrifugiert und 2 x mit PBS gewaschen. Um zu überprüfen, ob sich abzentrifugierbare Aggregate in den Ansätzen gebildet hatten wurden Proben ohne Mikrosomen mitgeführt und als nicht membranassoziierte Kontrolle diente Luziferase.

Das Mikrosomenpellet wurde in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 99°C erhitzt. Von den Expressionsansätzen wurden je 0,5 µl auf die Gele aufgetragen.

11.12 Liposomenpräparation und “pull down”

Ein Phospholipid-Mix, der die häufigsten Phospholipide der ER Membran enthält, wurde mit 7 % Cholesterol versetzt. 200 µl wurden entnommen und das Lösungsmittel unter Argon verdampft. Das getrocknete Lipidpellet wurde in 50 µl PBS aufgenommen, auf 55°C erhitzt und 10 mal durch einen *Mini Extruder* mit PC Membran 0,4 µm gepresst, um Liposomen gleicher Größe zu erhalten. In den Assoziationsexperimenten mit POMP wurden je 5 µl dieser Liposomenlösung eingesetzt. Die Liposomen wurden nach einer möglichen Bindung von POMP bei 17 500 g und 4°C für 30 min abzentrifugiert und 2 x mit PBS gewaschen. Das Liposomenpellet wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min auf 99°C erhitzt.

11.13 Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie

Fixierlösung: 3,7 % Paraformaldehyd in PBS

Waschlösung: 0,01 % Saponin, 0,25 % Gelatine in PBS

Sensibilisierungslösung: 50 mM NH_4Cl in PBS

Permeabilisierungslösung: Waschlösung + 0,2 % Triton-X 100

Mowiol: 2,4 g Mowiol 40-88, 6 g Glycerin und 6 ml H_2O mehrere Std. bei RT rühren. 12 ml 0,2 M Tris HCl (pH 8,5) zugeben und ca. 10 min auf 50°C erhitzen. Nichtgelöstes Mowiol bei 5 000 g für 15 min abzentrifugieren und die Lösung mit 2 % Diazobicyclo (2.2.2) Okтан versetzen.

Für indirekte Immunfluoreszenzen wurde ein steriler *10 well multitest*-Objektträgern in einer 10 Zentimeter Kulturschale mit HeLa bzw. CRL2429 Zellen inkubiert und bei 70%iger Konfluenz nach einmaligem Waschen mit PBS wieder entnommen. Die Zellen wurden 10 min bei RT fixiert, 3 mal 5 min sensibilisiert und für 30 min permeabilisiert. Nach 20 sec waschen wurden die Zellen mit 15 % FCS in PBS 15 min blockiert und daraufhin für 30 min mit primärem Antikörper (verwendete Antikörper s. Tab. 4) inkubiert. Dann wurden die Zellen 4 x 5 min mit Waschlösung und 2 mal kurz mit PBS gewaschen und mit sekundärem Antikörper (s. Tab. 6) für 45 min im Dunkeln inkubiert. Wiederum wurden die Zellen 4 x kurz mit Waschlösung gewaschen und gegebenenfalls im letzten Waschschrift mit einer 1%igen Dapi in PBS behandelt. Danach wurden die Zellen noch 2 mal kurz mit PBS gewaschen, in Mowiol eingebettet.

Für indirekte Immunfluoreszenzstudien mit zwei Antikörpern wurden sowohl die primären als auch die sekundären Antikörper im Gemisch inkubiert.

Tab. 6 In den indirekten Immunfluoreszenzen verwendete Sekundärantikörper

Gerichtet gegen	Herkunft	Verdünnung	Kopplung	Hersteller
Kaninchen	Ziege	1 : 1 000	Alexa 568	Molecular Probes
Maus	Ziege	1 : 1 000	Alexa 488	Molecular Probes

Konfokale Mikroskopie:

Für die Aufnahmen wurde ein Leica DM LFSA Mikroskop benutzt. Es wurden zwei unterschiedliche Linsen verwendet: A HCX APO L20 x 0,5w und HC APO CS 20 w0,95w. Der „pinhole airy“ lag zwischen 0,2 und 1,8. Helligkeits- und Kontrasteinstellungen und die Überlagerungen zweier Aufnahmen wurden in Adobe Photoshop 6.0 durchgeführt.

11.14 Fraktionierungen

11.14.1 Kernpräparationen

N-Puffer: 10 mM Tris HCl (pH 7,5), 2,5 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 M Saccharose, 0,5 M PMSF, Proteaseinhibitoren (Roche Mini), 100 µM ALDI

DS-Puffer: 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 1,6 bzw. 2,3 M Saccharose, 0,5 M PMSF, zusätzlich im 1,6 M Saccharose-Puffer: Proteaseinhibitoren (Roche Mini), 10 µM MG132

Membran-Lysispuffer: 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 0,1 % SDS, 0,5 % NP-40, 1 mM EDTA, 10 µM MG132

RNAse-Stammlösung: 10 mg / ml, 10 min auf 80°C erhitzt

DNAse-Stammlösung: 4,25 mg / ml in 50 % Glycerol

Es wurden ca. $2-3 \times 10^7$ Zellen geerntet (s. 2.1.1) und das Pellet in 4 ml N-Puffer mit 0,02 % NP-40 resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch 60 Hübe in einem 5 ml Potter auf Eis und die Zelllyse wurden mit Trypanblau-Färbung unter dem Lichtmikroskop überprüft. Die Probe wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und die Kerne bei 800 g, 4°C für 10 min abzentrifugiert. Die Kerne wurden 3 x mit der max. Menge N-Puffer gewaschen, in 3 ml DS-Puffer mit 1,6 M Saccharose resuspendiert und über 1 ml DS-Puffer mit 2,3 M Saccharose in einem SW 60-Ultrazentrifugenröhrchen geschichtet. Die Kernfraktion wurde bei 100 000 g und 4°C für 1 h zentrifugiert.

Die Kerne wurden aus der Grenzschicht der Saccharoselösungen mit einem Spatel entnommen, in 2 ml N-Puffer ohne Saccharose aufgenommen und mit 50 µl DNAse-Lösung und 20 µl RNAse-Lösung inkubiert. Dann wurde 1 ml 2 M KCl Lösung zugegeben und 30 min auf Eis gerührt. Die Kerne wurden mit 5 x 6 Cyclen an der Ultraschallsonde aufgeschlossen. Die Probe wurde erneut im SW 60 Rotor bei 100 000 g, 4°C für 45 min abzentrifugiert und die nukleoplasmatische Fraktion abgenommen.

11.14.2 Präparation durch 100 000 g Zentrifugation

Puffer Mg²⁺: 10 mM Hepes pH 7,2; 80 mM KAc; 5 mM MgAc₂; 5 mM MgCl₂; Proteaseinhibitor-Cocktail EDTA frei, 10 µM MG132

Puffer –Mg²⁺: 10 mM Hepes pH 7,2; 80 mM KAc; Proteaseinhibitor-Cocktail EDTA frei, 10 µM MG132

1×10^6 HeLa Zellen wurden im Puffer mit Magnesium bzw. ohne Magnesium aufgeschlossen. Während der Experimente mit siRNA gegen POMP (s. Kap. 9.3) wurde immer der Puffer mit Magnesium verwendet. Die Zellen wurden durch 3 „freeze/thaw“-Zyklen lysiert und die Zelltrümmer einschließlich der Membranen bei 100 000g für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit

SDS-Probenpuffer versetzt und das Pellet in Puffer mit 0,25 % Triton-X für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden erneut abzentrifugiert und der Extrakt mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 5 min auf 99°C erhitzt und in Western Blots analysiert. Es wurden ungefähr gleiche Mengen der löslichen und der pelletierten Fraktion eingesetzt. Die Auftragung wurde nach den ersten Western Blots angepasst, um gleiche Mengen der maturierten Untereinheiten als interne Kontrolle aufzutragen.

11.14.3 Mikrosomenanreicherung – Differentielle Zentrifugation

Puffer A: 10 mM Hepes pH 7,2; 80 mM KAc; 5 mM MgAc₂; 5 mM MgCl₂; 250 mM Saccharose; Proteaseinhibitor-Cocktail EDTA frei, 10 µM MG132

1 x 10⁸ HeLa Zellen wurden in 10 ml Puffer A aufgenommen und mit 10 Hüben in einem 15 ml Potter auf Eis aufgeschlossen. Die Zelllyse wurde mit Trypanblau-Färbung im Lichtmikroskop überprüft. In den folgenden Zentrifugationsschritten wurde jeweils der Überstand weiterverwendet: 2 x 10 min, 700 g, 4°C / 2 x 20 min, 8 000 g, 4°C / 1 x 20 min, 15 000 g, 4°C.

Die Mikrosomen wurden dann bei 100 000 g für 1 h bei 4°C im SW 60-Rotor abzentrifugiert, mit 1 ml Puffer A gewaschen und im TLA 120.2 erneut abzentrifugiert. Das Mikrosomenpellet wurde in 20 µl Puffer aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

11.14.4 „floatation“ Experimente und waschen von Mikrosomen mit Salz

Puffer A (s. Kap. 11.14.3) mit 0,5 M Saccharose

Es wurden 1 x 10⁸ (1 x 10⁷ bei radioaktiver Markierung s. Kap. 9.2) HeLa Zellen geerntet, in Puffer A aufgenommen und mit 10 Hüben im Potter aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde mit Saccharose auf eine Endkonzentration von 2,0 M Saccharose angereichert und in ein SW 40 Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Dann wurde das Lysat mit einem kontinuierlichen Saccharosegradienten von 2,0 M bis 1,0 M überschichtet und bei 100 000 g und 4°C für 6 h zentrifugiert. Der Gradient wurde in 250 µl Fraktionen von oben abgenommen. Für anschließende SDS-Gelelektrophoresen wurden Proben aus den Gradientenfraktionen entnommen und mit SDS-Probenpuffer für 5 min bei 99°C denaturiert. Für Waschexperimente wurden die mikrosomenhaltigen Fraktionen vereinigt und mit Puffer A auf 250 mM Saccharose verdünnt. Dann wurden die Mikrosomen erneut bei 100 000 g für 1 h abzentrifugiert.

Die abzentrifugierten Mikrosomen wurden in 100 µl Puffer A aufgenommen, in 10 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Waschen der Mikrosomen:

Es wurden 10 µl Mikrosomen mit ansteigenden Konzentrationen KCl in Puffer A gewaschen. Dafür wurden die Mikrosomen bei 100 000 g bei 4°C für 30 min pelletiert und nacheinander mit Puffern mit ansteigender KCl Konzentration (0,25 M, 0,5 M und 0,75 M) jeweils resuspendiert und erneut pelletiert. Die Überstände der Waschschrirte wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und das Mikrosomenpellet in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und alle Proben bei 99°C für 5 min denaturiert. Danach erfolgte eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot Analyse. Zur Kontrolle, ob die Membranen sich im Pellet befanden wurde das integrale ER Protein Calnexin verwendet.

Ergebnisse

12 *In vitro* Generierung von proteasomalen Biogeneseintermediaten

12.1 Expression aller proteasomaler Untereinheiten und bekannter Biogeneseenzyme im Retikulozytenlysatz

Um eine Biogenese des humanen 20S Proteasoms *in vitro* nachvollziehen zu können, wurde das dem humanen System am nächsten stehende *in vitro* Expressionssystem, das Retikulozytenlysatz, gewählt. Alle humanen Untereinheiten und die Assemblierungsfaktoren PAC1, PAC2 und POMP wurden in Expressionsvektoren kloniert, so dass nur die kodierende Sequenz jedes Proteins transkribiert und translatiert wird. Die Untereinheiten wurden in Gegenwart von radioaktiv markiertem Methionin/Cystein translatiert. Es wurde getestet, ob die Untereinheiten exprimiert werden und ob eine ungünstig hohe Degradation proteasomaler Untereinheiten beziehungsweise von an der Biogenese beteiligten Proteinen im Retikulozytenlysatz stattfindet. Dafür wurden Proben der Expressionsansätze auf SDS-Gele geladen und die Proteine mittels Autoradiographie detektiert (Abb. 9). Für die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ und das Protein PAC2 konnten deutliche Degradationsbanden beobachtet werden. Es waren dennoch ausreichende Mengen der proteasomalen Untereinheiten im Reaktionsmix zu detektieren. Da PAC2 einer gravierenden Degradation unterliegt, wurde im Vergleich zu den anderen Proteinen die dreifache DNA Menge eingesetzt, um ausreichende Mengen dieses Proteins in späteren Coexpressionen zu gewährleisten. $\beta 5$ scheint als einzige Untereinheit im Retikulozytenlysatz bereits einen ersten Maturierungsschritt zu durchlaufen, ist jedoch ebenso in ausreichender Menge als vollständiges Proprotein vorhanden. Auch die Assemblierungsproteine POMP und PAC1 wurden in adäquaten Mengen exprimiert. In den weiteren Ansätzen wurden gleiche Mengen DNA jeder Untereinheit und der Assemblierungsfaktoren POMP und PAC1 in den Retikulozytenlysatz-Ansätzen eingesetzt.

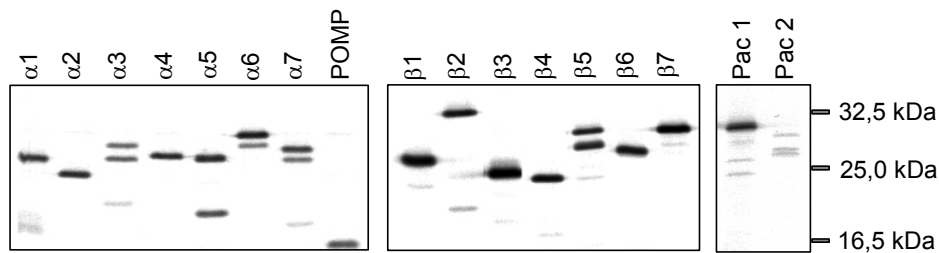


Abb. 9 Autoradiographie einer SDS-PAGE Analyse aller proteasomaler Untereinheiten und der Assemblierungsfaktoren nach der Expression im TNT-T7-Retikulozytenlysat-System. Es wurden gleiche Mengen DNA in den Ansätzen eingesetzt, 1 h bei 30°C exprimiert und gleiche Volumina auf das SDS Gel geladen. Alle Untereinheiten ordnen sich gemäß ihrem Molekulargewicht an und werden mit Ausnahme von PAC2 in vergleichbaren Mengen synthetisiert.

12.2 Auftrennung der Biogeneseintermediate in einem Saccharosegradienten

In zwei Ansätzen wurden folgende Proteine gemeinsam exprimiert: im ersten Ansatz alle proteasomalen Untereinheiten (α_{1-7} β_{1-7}) mit PAC1, PAC2 und POMP und im zweiten Ansatz die sieben α -Untereinheiten (α_{1-7}) und die Assemblierungsfaktoren PAC1, PAC2 und POMP. Die Expression und Markierung mit S^{35} erfolgte für 6 Stunden, um einem Assemblierungsprozess genug Zeit zu geben. Danach wurden die Proben in einer Saccharosegradientenzentrifugation der Größe nach aufgetrennt. Die gewonnenen Fraktionen wurden einer SDS-PAGE unterzogen und die Gele autoradiographisch analysiert (Abb. 10). Aufgrund des bekannten Laufverhaltens von Proteasomen und einigen Biogeneseintermediaten konnte eine Zuordnung der Fraktionen zu möglichen Komplexen getroffen werden.

Es entstanden keine Komplexe, die in den Fraktionen des 20S Proteasoms sedimentierten. Daher kann die Bildung eines vollständigen Partikels ausgeschlossen werden. Es bestand allerdings die Möglichkeit, dass sich distinkte Vorläuferkomplexe gebildet hatten, die sich auf die Fraktionen 7-14 verteilen. In diesen Fraktionen sind zwei deutlich verschiedene Bandenmuster zu erkennen, was den Schluss zulässt, dass es sich um zwei Komplexe unterschiedlicher Zusammensetzung handelt. Das Assemblierungsprotein POMP konnte vor allem in den Fraktionen 1-3 detektiert werden, in denen vornehmlich monomere Untereinheiten sedimentieren, aber auch in den Fraktionen 8-13. Dabei gab es deutliche Anreicherungen von POMP in den Fraktionen 10 und 11 bei Expression aller Untereinheiten

und in den Fraktionen 8 und 9 bei alleiniger Expression der α -Untereinheiten. Das bedeutet, dass sowohl die α -Untereinheiten allein wahrscheinlich einen Komplex bilden, der mit POMP interagiert, als auch dass alle proteasomalen Untereinheiten einen etwas größeren Vorläuferkomplex formieren, der POMP enthält.

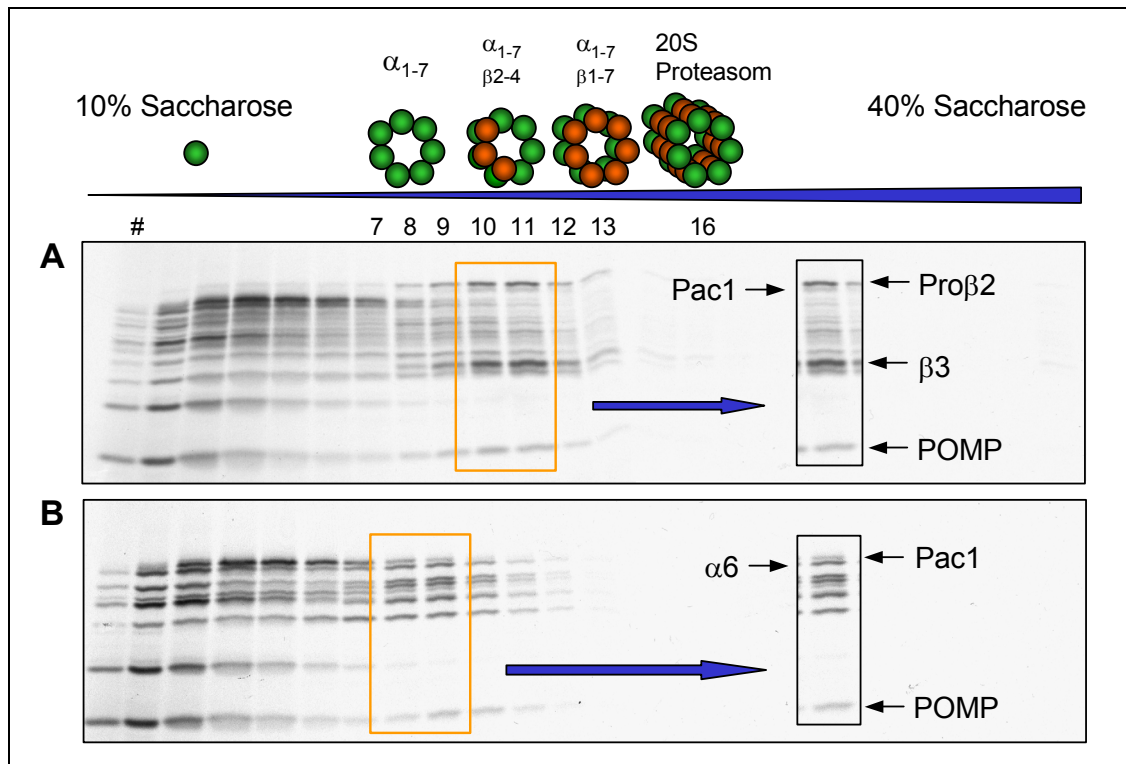


Abb. 10 Autoradiographie der in einer SDS-PAGE analysierten Saccharosegradientenfraktionen. Aufgrund bekannter Sedimentationseigenschaften einiger Assemblierungsintermediate sind mögliche Komplexe oberhalb des Gradienten schematisch dargestellt. A Retikulozytenlysat Ansatz in dem alle proteasomalen Untereinheiten sowie POMP, PAC1 und PAC2 exprimiert wurden B Retikulozytenlysat Ansatz in dem alle α -Untereinheiten, POMP, PAC1 und PAC2 exprimiert wurden.

In dem Gradienten A (Abb. 10) ist deutlich zu erkennen, dass die $\beta 3$ Untereinheit erst in dem größeren Komplex detektiert werden kann und nicht in den Fraktionen, für die ein α -Ring postuliert wird. $\beta 3$ ist leicht zu identifizieren, da es aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung stärker markiert ist als die übrigen Untereinheiten.

Da Hirano *et al.* (2005) eine Interaktion des α -Ringes im Retikulozytenlysat mit den Proteinen PAC1 und PAC2 beschrieben, wurden diese beiden Proteine in den

Reaktionsansätzen coexprimiert. PAC1 ist aufgrund seines Molekulargewichtes in den Gradienten zwischen den proteasomalen Banden identifizierbar. In beiden Gradienten wäre es möglich, dass PAC1 mit den Komplexen cosedimentiert. PAC2 liegt aufgrund seines Molekulargewichtes inmitten des Bandenmusters des 20S Proteasoms, wodurch keine Aussage über die Migration von PAC2 im Vergleich zu den proteasomalen Untereinheiten gemacht werden kann.

12.3 Nativgelelektrophorese der *in vitro* generierten Komplexe

Zur weiteren Analyse der im Retikulozytenlysat entstandenen Komplexe wurden diese auf einem nicht denaturierenden Gradientengel aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde ein Größenmarker und isoliertes 20S Proteasom aus Erythrozyten mit aufgetrennt. Es konnten zwei Komplexe detektiert werden, die in den Fraktionen 7-9 und 11-13 im Gradienten A vorkommen. Auf einem nicht denaturierenden Gel wurden die Komplexe aus Fraktion 7 des Gradienten B und aus Fraktion 13 des Gradienten A analysiert (Abb. 11).

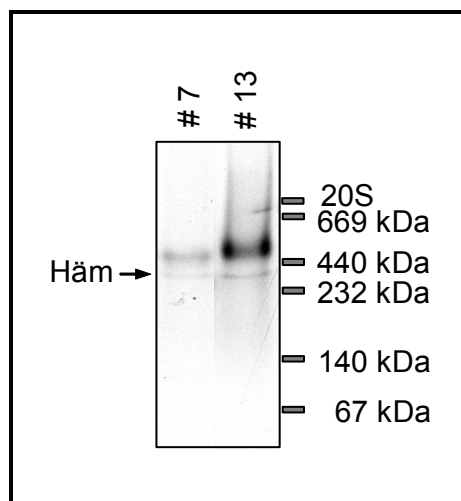


Abb. 11 Nicht denaturierende Gelelektrophorese der in Retikulozytenlysat-Ansätzen aus Kapitel 12.2 generierten Komplexe. Die Fraktion 7 aus Gradient B und die Fraktion 13 aus Gradient A wurden in einem 3,5-8 prozentigen Nativ-Gradienten-Gel aufgetrennt. (Häm = Hämoglobinkomplexe)

Die Sedimentation der Komplexe in den Saccharosegradienten entsprach der eines α -Ringes und eines 13S Vorläuferkomplexes. Bezogen auf den Marker im nicht denaturierenden Gradientengel haben diese Komplexe ein kalkuliertes Molekulargewicht von ungefähr 500 kDa.

Das theoretische Molekulargewicht eines α -Ringes ohne Chaperone und akzessorische Proteine beträgt ca. 200 kDa und das eines 13S Vorläuferkomplexes ca. 270 kDa. Sowohl eine Assoziation mit akzessorischen Proteinen als auch eine Exposition von Ladungen oder sterische Eigenschaften der Komplexe können ein anderes Migrationsverhalten gegenüber dem Marker unter nicht denaturierenden Bedingungen verursachen.

In Abbildung 11 ist dennoch ein Größenunterschied der beiden Komplexe erkennbar. Die geringe Differenz könnte den 3-4 Untereinheiten entsprechen, in denen sich beide Komplexe unterscheiden. Damit bestätigt sich zumindest der Größenunterschied der beiden Komplexe, der im Saccharosegradient bereits beobachtet werden konnte (s. Kap. 12.2).

12.4 Immunpräzipitation und 2D-Gel Analyse der Komplexe

Um die Untereinheitenzusammensetzung der proteasomalen Assemblierungsintermediate aus dem *in vitro* System zu analysieren, wurden die Fraktionen 7-9 aus dem Gradienten B und 11-13 aus dem alle Untereinheiten enthaltenen Gradienten A gepoolt und mit einem gegen $\alpha 6$ oder Pre20S gerichteten Antikörper immunpräzipitiert und im 2D-Gel aufgetrennt (Abb. 12). Da das Laufverhalten aller Untereinheiten des 20S Proteasoms in der 2D-Gelelektrophorese bekannt war, wurde zur Identifizierung der proteasomalen Bestandteile gereinigtes 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten parallel in den selben Gelen aufgetrennt, Coomassie gefärbt und diente so als Vorlage zur Identifizierung der radioaktiv markierten Untereinheiten (Abb. 12 A und B).

In den Fraktionen 7-9 konnte ein Komplex aus allen sieben α -Untereinheiten und dem Assemblierungsprotein POMP identifiziert werden (Abb. 12 C), während in den Fraktionen 11-13 ein Komplex aus allen sieben α -Untereinheiten mit vier β -Untereinheiten (Pro β 2, β 3, β 4 und Pro β 6) und dem Assemblierungsfaktor POMP sedimentieren (Abb. 12 D). Bei dem „kleineren“ Komplex könnte es sich damit um einen α -Ring handeln, der von Hirano *et al.* (2005) als physiologischer Komplex beschrieben wurde.

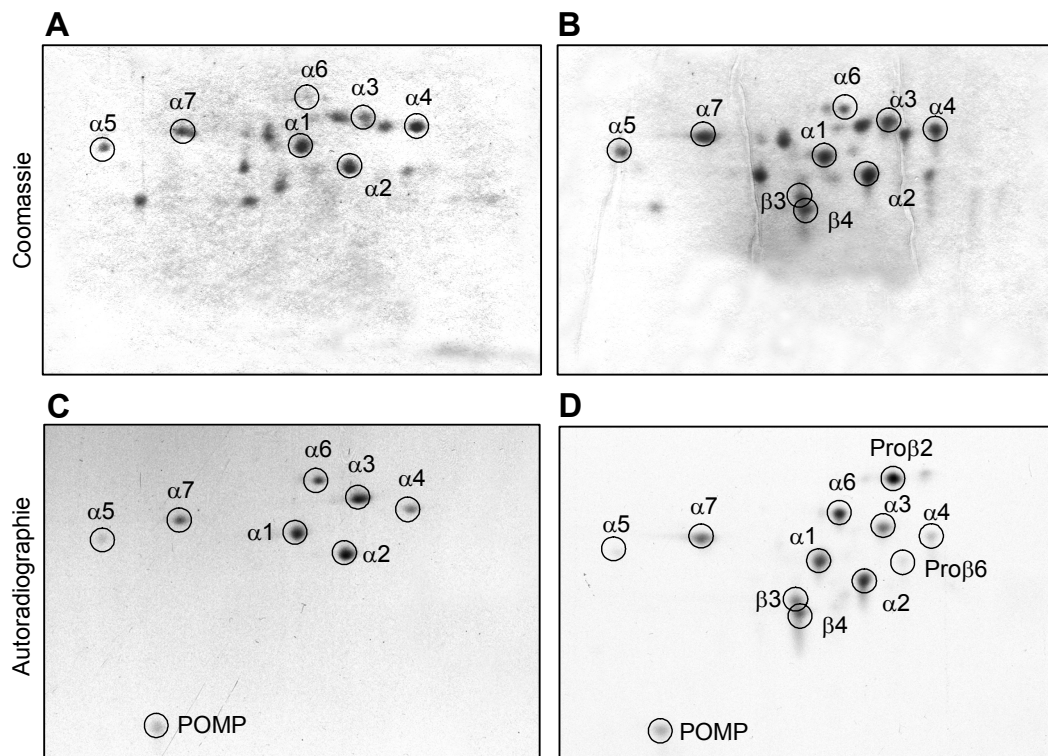


Abb. 12 2D-Gel-Analyse der aus den Saccharosegradienten in Kapitel 12.2 isolierten Komplexe nach der Immunpräzipitation mit den gegen $\alpha 6$ und Pre20S gerichteten Antikörpern. A und B Coomassie-Färbungen des Erythrozytenproteasoms zur Identifizierung radioaktiver Untereinheiten. C Immunpräzipitation aus den Fraktionen 7-9 mit dem gegen $\alpha 6$ gerichteten Antikörper aus dem Gradienten B (s. Kap. 12.2) (Expressionsansatz: $\alpha 1-7$, POMP, PAC1 und PAC2). D Immunpräzipitation mit dem gegen Pre20S gerichteten Antikörper aus den Fraktionen 10-13 aus dem Gradienten A (s. Kap. 12.2) (Expressionsansatz: $\alpha 1-7$, $\beta 1-7$ POMP, PAC1 und PAC2).

Es konnte allerdings unter den hier angewandten experimentellen Bedingungen keine Assoziation der Komplexe mit PAC1 und PAC2 festgestellt werden. Aufgrund der publizierten Salzlabilität der Interaktion eines α -Ringes mit PAC1 und PAC2 sind auch Experimente unter Niedrigsalzbedingungen durchgeführt worden, in denen jedoch ebenfalls keine Assoziation der α -Untereinheiten mit PAC1 und PAC2 gefunden werden konnte (nicht gezeigte Daten).

Bei dem größeren Komplex handelt es sich um den bereits in mehreren Publikationen beschriebenen 13S Vorläuferkomplex (Frentzel *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1997; Schmidtke *et al.*, 1997). Um auszuschließen, dass es sich bei dem charakterisierten größeren Komplex um

einen Komplex mit einer unphysiologischen Zusammensetzung oder Konformation handelt, wurde die Immunpräzipitation mit dem gegen Pre20S gerichteten Antikörper, der spezifisch für 13S Vorläuferkomplexe ist, durchgeführt. Durch die Immunpräzipitation des 13S Vorläuferkomplexes mit dem gegen Pre20S gerichteten Antikörper wurde eine für Vorläuferkomplexe spezifische Konformation der entstandenen Komplexe nachgewiesen. Zur Bestätigung, dass dieser Komplex auch *in vivo* besteht, wurden Experimente angeknüpft, die im folgenden Kapitel dargestellt werden.

13 Charakterisierung von proteasomalen Biogeneseintermediaten *in vivo*

13.1 Immunpräzipitation und 2D-Gel Analyse des 13S Vorläuferkomplexes

Um die in Kapitel 12.4 behandelten distinkten Assemblierungskomplexe auch *in vivo* nachzuweisen, wurden Immunpräzipitationen mit dem gegen Pre20S gerichteten Antikörper aus Gesamtzellextrakten durchgeführt. Dabei sollte ergründet werden, inwiefern der *in vitro* generierte 13S Vorläuferkomplex (s. Kap. 12.4) in gleicher Weise auch *in vivo* nachweisbar ist. Um auch dem 13S Vorläuferkomplex vorangehende, aus nur wenigen Untereinheiten bestehende Assemblierungsintermediate zu identifizieren, wurden Saccharosegradientenzentrifugationen mit Gesamtzellextrakten durchgeführt und Immunpräzipitationen aus einzelnen Fraktionen mit dem gegen $\alpha 6$ gerichteten Antikörper angefertigt.

HeLa Zellen wurden für zwei Stunden mit radioaktiv markierten Aminosäuren inkubiert und Gesamtzelllysate hergestellt. Der Versuch, aus Saccharosegradientenfraktionen aus nur zwei bis sechs proteasomalen Untereinheiten zusammengesetzte Komplexe zu immunpräzipitieren, ist nicht gelungen (nicht gezeigt Daten), da es sich *in vivo* wahrscheinlich bei Komplexen aus α -Untereinheiten und α -Ring um äußerst kurzlebige Intermediate handelt, die mit den angewandten Methoden nicht detektiert werden können. Um den 13S Vorläuferkomplex zu isolieren, wurden Immunpräzipitationen mit dem gegen Pre20S gerichteten Antikörper und einem gegen $\beta 7$ gerichteten Antikörper, der vor allem reife Proteasomen bindet, aus Gesamtzelllysaten durchgeführt. Die präzipitierten Komplexe wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 13a).

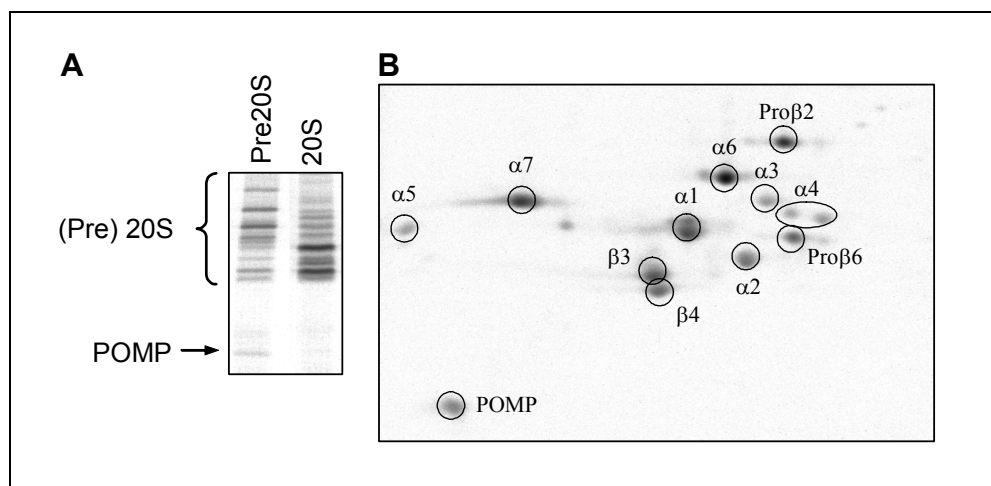


Abb. 13 A Autoradiographie einer SDS-PAGE von aus Gesamtzelllysaten angefertigten Immunpräzipitationen. Proteasomale Vorläuferkomplexe wurden mit dem gegen Pre20S gerichteten Antikörper und maturierte 20S Proteasomen mit dem gegen $\beta 7$ gerichteten Antikörper immunpräzipitiert. B Autoradiographie der 2D-Gelanalyse der immunpräzipitierten Assemblierungsintermediate (Pre20S).

Das Bandenmuster beider Komplexe unterscheidet sich in der SDS-PAGE deutlich voneinander. Der 13S Vorläuferkomplex beinhaltet einen größeren Anteil Proteine mit einem höheren Molekulargewicht verglichen mit den detektierten Banden des 20S Proteasoms nach Immunpräzipitation mit dem gegen $\beta 7$ gerichteten Antikörper (Abb. 13a). Zusätzlich enthält der Vorläuferkomplex das Assemblierungsprotein POMP, während in reifen 20S Proteasomen kein POMP detektiert werden kann.

Der Vorläuferkomplex wurde im 2D-Gel analysiert, um die enthaltenen proteasomalen Untereinheiten dieses Komplexes zu identifizieren (Abb. 13b). Im 2D-Gel zeigte sich, dass der Komplex wie von Nandi *et al.* (1997) beschrieben aus allen sieben α -Untereinheiten und den β -Untereinheiten $\text{Pro}\beta 2$, $\beta 3$, und $\beta 4$ besteht. Außerdem enthalten diese Komplexe $\text{Pro}\beta 6$ und den Assemblierungsfaktor POMP, die auch bereits in den Experimenten von Nandi *et al.* (1997) auftraten, jedoch nicht berücksichtigt wurden ($\text{Pro}\beta 6$) beziehungsweise noch nicht identifiziert waren (POMP). Dabei handelt es sich bei den aus HeLa Gesamtzelllysat isolierten Komplexen um rein konstitutive Vorläuferkomplexe. Es konnten keine Immununtereinheiten im 2D-Gel detektiert werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass der im Retikulozytenlysat generierte 13S Vorläuferkomplex (s. Kap. 12.4) durch den gleichen konformationsspezifischen Antikörper gegen Pre20S gerichtet immunpräzipitiert werden kann, wie sein *in vivo* vorkommendes Pendant. Darüber hinaus konnte die genaue Untereinheitenzusammensetzung des 13S Vorläuferkomplexes konstitutiver 20S Proteasomen in HeLa Zellen bestimmt und auch hier eine Übereinstimmung mit den *in vitro* erzeugten Komplexen festgestellt werden. Somit ist es erstmals gelungen ein distinktes Assemblierungsintermediat des humanen 20S Proteasoms in einem *in vitro* System zu generieren.

13.2 Zeitlicher Verlauf des Untereinheiteneinbaus in proteasomale Komplexe in HeLa Zellen

Um eine zeitliche Reihenfolge des Untereinheiteneinbaus in 20S Proteasomen zu determinieren, wurden HeLa Zellen für unterschiedliche Zeiträume in Gegenwart von radioaktivem Methionin und Cystein kultiviert und der Einbau radioaktiver Untereinheiten in das 20S Proteasom analysiert.

Die Zellen wurden 15, 30, 60 und 120 Minuten in ^{35}S -methionin-/cysteinhaltigem Medium inkubiert und anschließend wurden Gesamtzelllysate hergestellt. Mit je 3 μl der Gesamtzelllysate wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Der Einbau radioaktiver Aminosäuren nimmt relativ zur Inkubationszeit zu, wie in der autoradiographischen Analyse zu erkennen ist (Abb. 14a). Gleichzeitig wurden je 10 μl der Gesamtzelllysate in einem Szintillations-Counter gemessen, so dass der Einbau der Radioaktivität über die Zeit graphisch dargestellt werden kann (Abb. 14b). Der Einbau der markierten Aminosäuren in die Proteine erfolgte nahezu linear, was für einen gleichmäßigen Stoffwechsel mit gleichmäßiger Translation der Zellen spricht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Assemblierung und Maturierung der Proteasomen unter zellphysiologischen Bedingungen stattgefunden hat.

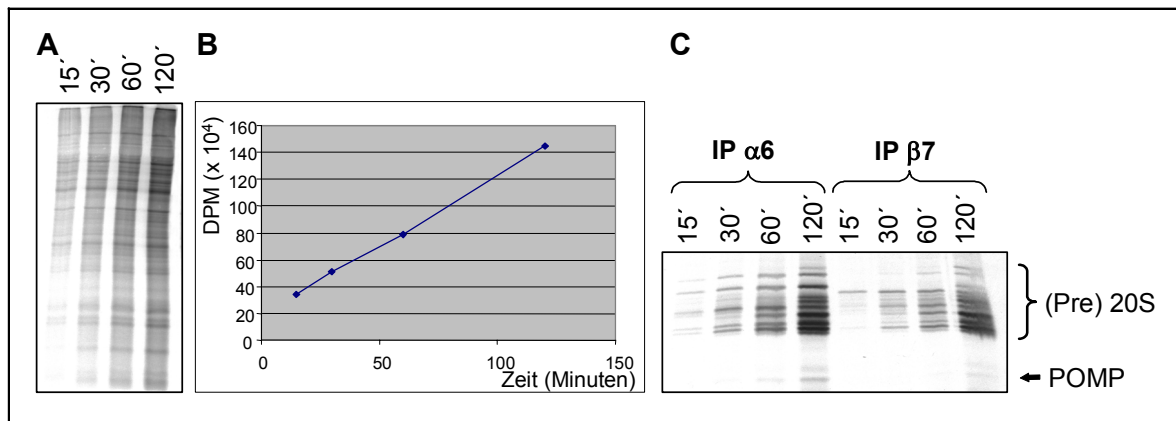


Abb. 14 A Autoradiographische Auswertung einer SDS-PAGE von HeLa Gesamtzelllysaten. Die Zellen wurden für 15, 30, 60 und 120 Minuten in Gegenwart radioaktiv markierten Cysteins und Methionins kultiviert und gleiche Mengen Lysat in einer SDS-PAGE analysiert. B Gleiche Mengen der Proben wurde in einem Szintillations-Counter gemessen und die radioaktive Markierung im Verhältnis zur Zeit aufgetragen. C Immunpräzipitationen mit dem gegen $\alpha 6$ gerichteten Antikörper ((Pre)20S und matures 20S) und dem gegen $\beta 7$ gerichteten Antikörper (matures 20S) aus den Gesamtzelllysaten. Eine Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und eine Detektion durch Autoradiographie.

Aus den Gesamtzelllysaten wurden Immunpräzipitationen mit Antikörpern gerichtet gegen die Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 7$ durchgeführt. Der gegen $\alpha 6$ gerichtete Antikörper präzipitiert sowohl proteasomale Vorläuferkomplexe als auch reife Proteasomen, während der gegen $\beta 7$ gerichtete Antikörper Proteasomen in einem sehr späten Assemblierungs- und Maturierungsstadium und reife Proteasomen präzipitiert. Die Präzipitate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 14c). Eine Zunahme der Intensität radioaktiver Signale relativ zur Zeit ist auch in den Immunpräzipitationen deutlich zu erkennen, beruht aber nicht allein auf Zunahme einzelner Banden, sondern auch auf der Komplettierung des Bandenmusters im Verlauf der Zeit.

Bereits in einer eindimensionalen Auftrennung sind Unterschiede in den Zusammensetzungen der von beiden Antikörpern präzipitierten Komplexe zu erkennen. Während zu Anfang nur wenige Untereinheiten detektierbar waren, komplettiert sich das Bandenmuster nach längeren „pulse“-Zeiten in beiden Ansätzen. Frisch synthetisierte und direkt in Komplexe integrierte Untereinheiten erscheinen zuerst in den Präzipitaten. Das Auftreten einzelner Banden nach kurzen „pulse“-Zeiten spricht für den Einbau radioaktiver Untereinheiten in bereits vorassemblierte Komplexe mit unmarkierten Untereinheiten. Um die Untereinheitenzusammensetzung der immunpräzipitierten Komplexe identifizieren zu können, wurden 2D-Gel Analysen durchgeführt.

13.3 2D-Gel Analyse von Biogeneseintermediaten und 20S Proteasomen nach unterschiedliche langer Markierung mit radioaktivem ^{35}S

Die in Kapitel 13.2 beschriebenen Präzipitate wurden in 2D-Gelen analysiert (Abb. 15 und 16). Hiermit sollten die in der SDS-PAGE auftretenden Banden definierten Untereinheiten zugeordnet werden. So können Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf des Einbaus einzelner Untereinheiten in Vorläuferkomplexe und in das 20S Proteasom gezogen werden. Außerdem können Untereinheiten identifiziert werden, die bereits in vorassemblierten Komplexen in der Zelle vorliegen oder aber eine limitierende Rolle während des Assemblierungsprozesses einnehmen.

Eine Markierung neu synthetisierter Untereinheiten des 20S Proteasoms erfolgte über den Einbau radioaktiver Aminosäuren. Diese Untereinheiten wurden in proteasomale Komplexe inkorporiert und mit den Antikörpern gegen 20S Proteasomen und Assemblierungsintermediate gerichtet immunpräzipitiert. Je kürzer die Zellen mit radioaktivem Methionin und Cystein inkubiert wurden, desto kleiner ist der Zeitraum, in dem mRNA in Proteine translatiert wird. Es ist davon auszugehen, dass neu synthetisierte und direkt eingebaute Untereinheiten des 20S Proteasoms zum Abschluss der Assemblierung des 20S Proteasoms überleiten, so dass mit kurzen „pulse“-Zeiten ausschließlich spät in Komplexe integrierte Untereinheiten markiert werden. Alle bereits vor Beginn der „pulse“-Zeit assemblierten Intermediate bleiben bei dieser Versuchsdurchführung unmarkiert. Eine andere Möglichkeit wäre der Einbau in der Zelle frei vorkommender bereits synthetisierter monomerer Untereinheiten. Dann kämen jedoch den zuletzt eingebauten Untereinheiten wichtige regulatorische Funktionen, die Proteasomenhomöostase in der Zelle betreffend, zu.

Zur richtigen Interpretation der Experimente muss beachtet werden, dass nicht alle Untereinheiten des 20S Proteasoms in gleichem Maße Methionin und Cystein enthalten, was zu einer unterschiedlich starken Gesamtmarkierung der Untereinheiten führt. Besonders zu berücksichtigen ist in diesem Fall die Untereinheit $\beta 3$, in dessen Aminosäuresequenz im Vergleich zu allen übrigen Untereinheiten deutlich mehr Methionin und Cystein enthalten ist und die daher schneller detektierbar ist. Weiterhin fokussieren einige Untereinheiten in der NEpHGE schlechter als andere, so dass einige Untereinheiten kaum detektierbar sind (z.B. $\beta 5$). Weiterhin verteilen sich einige Untereinheiten auf mehrere Spots, was wahrscheinlich auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen ist (Kuckelkorn *et al.*, 2002). Das gilt in

besonderem Maß für die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\beta 5$. 2D-Gele der Immunopräzipitationen sind in Abbildung 15 und 16 zusammengestellt. Eine Übersicht über die beiden Experimente und das Auftreten der verschiedenen Untereinheiten ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Die radioaktiv markierten Untereinheiten des 20S Proteasoms sind durch das gleichzeitige Auftrennen gereinigter Proteasomen aus Erythrozyten und deren Coomassie-Färbung im 2D-Gel identifiziert worden (s. Überlagerungen der „IP 120“-Gele Abb.15 und 16 jeweils unten). Die Proformen der β -Untereinheiten wurden durch ihre bekanntes Laufverhalten gegenüber den maturierten Untereinheiten identifiziert (s. Kap. 11.6).

Der gegen $\beta 7$ gerichtete Antikörper (Abb. 15) präzipitiert ausschließlich die frei vorliegende Proform von $\beta 7$ und vollständige (meist maturierte) Proteasomen. Das wird durch die Tatsache untermauert, dass $\beta 7$ keine Komplexe präzipitiert, die POMP enthalten (s. Abb. 13 A und 14 C). Nach 15 Minuten radioaktiver Markierung der Zellen ist fast nur die freie Proform von $\beta 7$ zu detektieren, also sind noch keine Untereinheiten aus präzipitierten 20S Proteasomen detektierbar. Nach 30 Minuten sind die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\beta 1$ zusätzlich im Gel detektierbar. Dabei kann ausgeschlossen werden, dass es sich um einen Vorläuferkomplex aus den drei benachbarten Untereinheiten $\alpha 1$, $\beta 1$ und $\beta 7$ handelt, da in diesem Fall die Proform der $\beta 1$ Untereinheit assoziiert sein müsste. Die maturierte $\beta 1$ Untereinheit hingegen ist ausschließlich in vollständig assemblierten Proteasomen zu finden. Nach 60 Minuten ist als einzige zusätzliche Untereinheit die maturierte $\beta 7$ Untereinheit hinzugekommen. Das lässt den Schluss zu, dass eventuell $\alpha 1$ die letzte Untereinheit des 13S Vorläuferkomplexes ist und die Integration der Untereinheiten Pro $\beta 1$ und Pro $\beta 7$ dann erst ermöglicht. Nach 120 Minuten sind nahezu alle Untereinheiten des 20S Proteasoms detektierbar. Die Menge der maturierten $\beta 7$ Untereinheit übertrifft die der Proform bei weitem. Bis auf Pro $\beta 2$ ist keine weitere Proform der β Untereinheiten im Gel zu finden. Wahrscheinlich ist der kleine Anteil an Pro $\beta 2$ auf Partikel zurückzuführen, deren Assemblierung bereits beendet ist, aber in denen die Maturierung aller β -Untereinheiten noch nicht vollständig erfolgt ist.

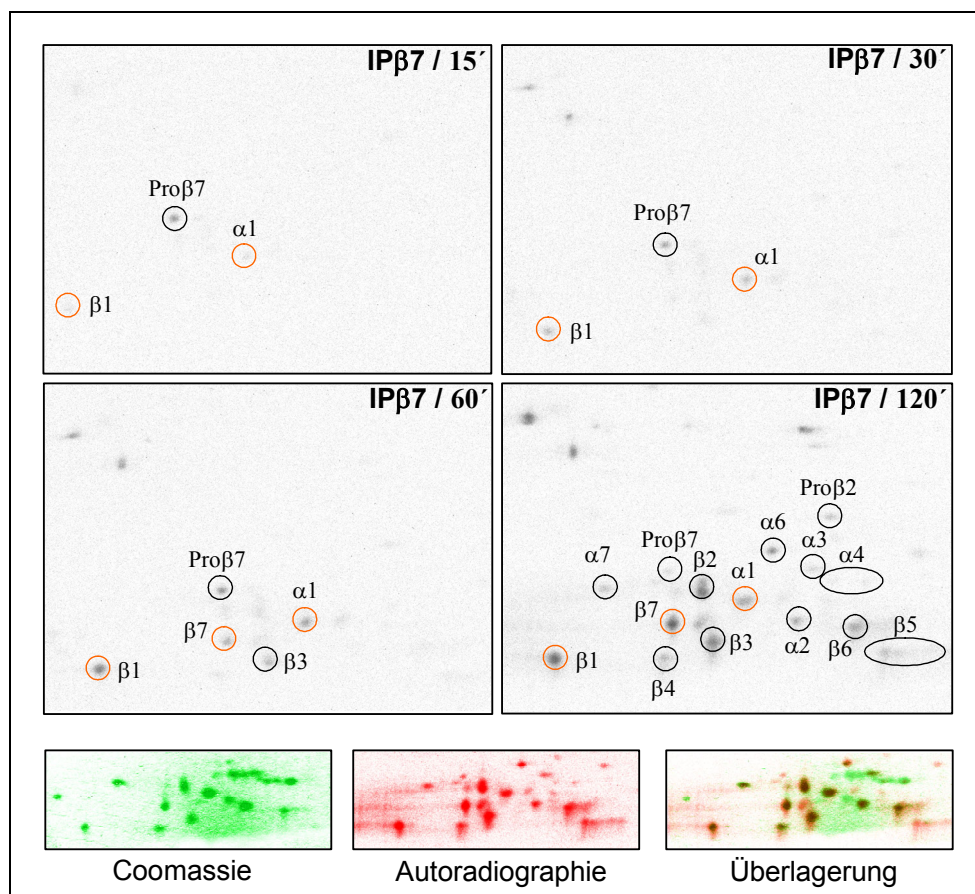


Abb. 15 2D-Gel Analyse der Immunpräzipitationen mit gegen $\beta 7$ gerichteten Antikörper aus radioaktiv markierten Gesamtzelllysaten. Zur Identifizierung der Untereinheiten wurde 20S Proteasom aus Erythrozyten in den selben Gelen aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. • Untereinheiten, die in beiden Experimenten gleichzeitig und frühzeitig detektierbar sind. In grün dargestellt die Coomassie-Färbung von Erythrozyten-Proteasom im Gel „IP $\beta 7 / 120'$ “, in rot die Autoradiographie des selben Gels.

Der gegen $\alpha 6$ gerichtete Antikörper präzipitiert sowohl reife 20S Proteasomen als auch Assemblierungsintermediate (Abb. 16). In den *in vitro* Experimenten (s. Kap 12) konnten der 13S Vorläuferkomplex und der α -Ring durch den gegen $\alpha 6$ gerichteten Antikörper erkannt und präzipitiert werden. *In vivo* können daher zumindest 20S Proteasomen, 13S Vorläuferkomplexe und α -Ringe durch diesen Antikörper gebunden werden. Über aus noch weniger Untereinheiten zusammengesetzte Komplexe kann keine Aussage getroffen werden. Die zweite Immunpräzipitation wurde durchgeführt, um zum einen parallel auftretende Untereinheiten präzipitierten 20S Proteasomen zuordnen zu können, da nur maturierte 20S Proteasomen von beiden Antikörpern erkannt werden und zum anderen, um Untereinheiten zu identifizieren, die nur mit dem gegen $\alpha 6$ gerichteten Antikörper präzipitiert werden und daher

letzte oder regulatorische Untereinheiten von Vorläuferkomplexe darstellen könnten. Nach 15 Minuten ist nahezu nur die $\alpha 6$ Untereinheit zu detektieren. Nach 30 Minuten liegen auch $\alpha 1$, $\beta 1$ und Pro $\beta 2$ radioaktiv markiert vor und nach 60 Minuten sind zusätzlich $\alpha 7$ und $\beta 7$ detektierbar, bevor zum letzten Zeitpunkt auch in diesem Ansatz alle Untereinheiten des 20S Proteasoms markiert sind. Wie oben bereits beschrieben handelt es sich bei den gewonnenen Präzipitaten um Komplexgemische, wodurch eine Zuordnung der detektierten Untereinheiten zu den spezifischen Komplexen nicht möglich ist

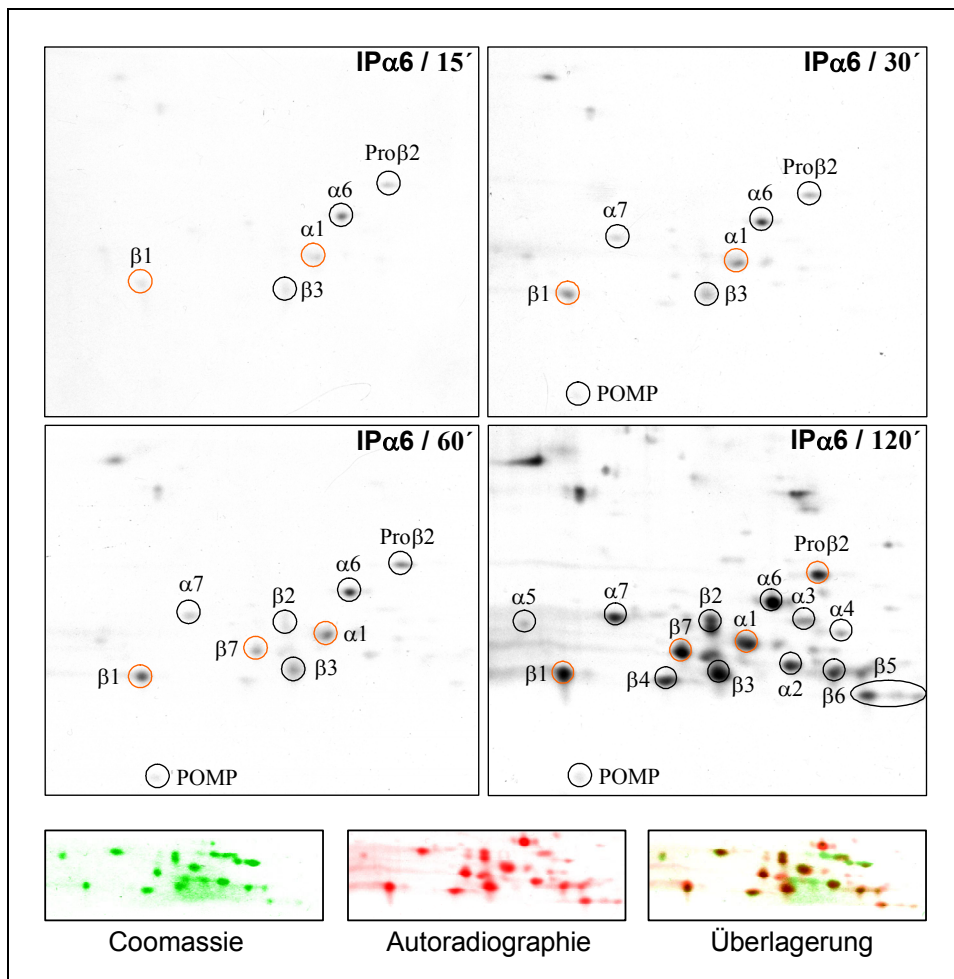


Abb. 16 2D-Gel Analyse der Immunpräzipitationen mit gegen $\alpha 6$ gerichteten Antikörper aus radioaktiv markierten Gesamtzelllysaten. Zur Identifizierung der Untereinheiten wurde 20S Proteasom aus Erythrozyten in den selben Gelen aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. • Untereinheiten, die in beiden Experimenten gleichzeitig und frühzeitig detektierbar sind. In grün dargestellt die Coomassie-Färbung von Erythrozyten-Proteasom im Gel „IP $\beta 7$ / 120“, in rot die Autoradiographie des selben Gels.

In beiden Experimenten traten parallel nach kurzen „pulse“-Zeiten die Untereinheiten $\alpha 1$, $\beta 1$ und etwas später die Untereinheit $\beta 7$ auf (s. Tab.7). Diese Untereinheiten sind damit die zuletzt translatierten und inkorporierten Untereinheiten vor der Dimerisierung zweier Halbproteasomen-Vorläuferkomplexe. Auf diese Weise kommt diesen Untereinheiten eine wichtige regulatorische Funktion zu. Die $\alpha 1$ Untereinheit könnte als letzte Untereinheiten des 13S Vorläuferkomplexes den α -Ring schließen und damit eine Konformationsänderung bewirken, die das Andocken der letzten β -Untereinheiten zulässt. Daraufhin können $\beta 1$ und $\beta 7$ als die den Dimerisierungsprozess initiiierenden Untereinheiten integriert werden. Auch die $\beta 5$ Untereinheit sollte zu den zuletzt eingebauten Untereinheiten zählen, da diese Untereinheit auch nach langen „pulse“-Zeiten nicht in 13S Vorläuferkomplexen zu finden war. Jedoch ist diese Untereinheit durch ihr weitläufiges Migrationsverhalten in den 2D-Gelen stets schwer detektierbar und daher kann keine Aussage über den Zeitpunkt des Einbaus von $\beta 5$ getroffen werden. Die in Abbildung 16 zusätzlich zu frühen Zeitpunkten auftretenden Untereinheiten $\alpha 7$ und Pro $\beta 2$ sind wahrscheinlich weitere spät in den 13S Vorläuferkomplex integrierte Untereinheiten.

Die Untereinheit $\alpha 5$ liegt als einzige Untereinheit in Zellen im Überschuss als monomere Untereinheit vor (Jorgensen und Hendil, 1999) und wird nicht radioaktiv markiert in die Komplexe integriert. Daher ist die Untereinheit $\alpha 5$ in den Coomassie-Färbungen isolierter Proteasomen, aber nicht oder kaum in der Autoradiographie immunpräzipitierter Proteasomenkomplexe nach zweistündiger radioaktiver Markierung zu detektieren.

	IP $\beta 7$	IP $\alpha 6$
15'	Pro $\beta 7$ ($\alpha 1$; $\beta 1$)	$\alpha 6$ ($\alpha 1$; $\beta 1$; Pro $\beta 2$; $\beta 3$)
30'	$\alpha 1$; $\beta 1$; Pro $\beta 7$	$\alpha 1$; $\alpha 6$; $\beta 1$; Pro $\beta 2$; ($\alpha 7$; $\beta 3$)
60'	$\alpha 1$; $\beta 1$; Pro $\beta 7$; $\beta 7$; ($\beta 3$)	$\alpha 1$; $\alpha 6$; $\alpha 7$; $\beta 1$; Pro $\beta 2$; $\beta 7$; ($\beta 3$)
120'	$\alpha 1-5$; $\alpha 6-7$; $\beta 1-7$; (Pro $\beta 2$; Pro $\beta 7$)	$\alpha 1-7$; $\beta 1-7$; Pro $\beta 2$

Tab. 7 Radioaktiv markierte und detektierbare Untereinheiten aus Abb. 15 und 16 zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Markierung von HeLa Zellen mit radioaktiven Methionin und Cystein. (...) schwach detektierbare Untereinheiten. • Untereinheiten, die in beiden Experimenten gleichzeitig und frühzeitig detektierbar sind.

14 Subzelluläre Lokalisation von proteasomalen Biogeneseintermediaten

Da komplexe Assemblierungsvorgänge in Zellen häufig an subzelluläre Kompartimente oder Strukturen gebunden stattfinden, sollte eine Lokalisation des proteasomalen Assemblierungsvorgangs vorgenommen werden.

14.1 Induktion von Immunoproteasomen nach Stimulation von HeLa Zellen mit IFN γ

Eine Anreicherung von Immunoproteasomen am ER ist bereits früher beschrieben worden (Brooks *et al.*, 2000b; Palmer *et al.*, 1996). Daher sollten Immunfluoreszenzaufnahmen der Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ nach Stimulation der Zellen mit IFN γ als Referenz für ER lokalisierte Proteasomen dienen. Um eine Induktion des Immunoproteasoms durch IFN γ und die Spezifität der Antikörper zu testen, wurden indirekte Immunfluoreszenzen mit HeLa Zellen durchgeführt, die 24h mit IFN γ stimuliert wurden bzw. unstimuliert waren (Abb. 17). Die Bilder wurden unter gleichen Bedingungen aufgenommen und bearbeitet. Nach 24 Stunden Inkubation mit IFN γ ist eine Induktion der beiden Immununtereinheiten und eine deutliche Markierung des ER zu beobachten.

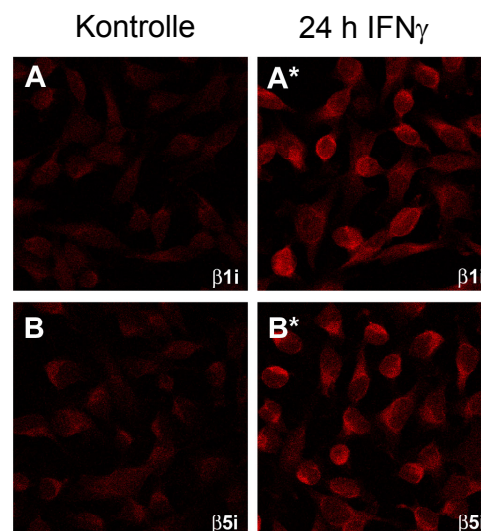


Abb. 17 Immunfluoreszenzaufnahmen von HeLa Zellen, die 24 h mit IFN γ stimuliert wurden (A* und B*) bzw. ohne Cytokin kultiviert wurden (A und B). Die Zellen wurden mit Antikörpern gerichtet gegen die Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ gefärbt und unter gleichen Bedingungen aufgenommen, um eine Zunahme der Fluoreszenz nach der Stimulation mit IFN γ verfolgen zu können.

14.2 Lokalisation proteasomaler Biogeneseintermediate in HeLa und CRL2429 Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz

Um Assemblierungsintermediate von 20S Proteasomen zu lokalisieren, wurden Immunfluoreszenzstudien mit Antikörpern gerichtet gegen den 13S Vorläuferkomplex (Pre20S), POMP und die Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ durchgeführt, während zum direkten Vergleich der Lokalisation die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gerichtet gegen 20S Proteasomen bzw. das ER Chaperon Calnexin gefärbt wurden (Abb. 18 und 19).

Für 20S Proteasomen ist eine Lokalisation in Cytoplasma, Zellkern mit ausgesparten Nukleoli und an der cytoplasmatischen Seite des ER bereits beschrieben worden (Wojcik und DeMartino, 2003) und konnte auch in HeLa und CRL2429 Zellen beobachtet werden. Die Assemblierungsintermediate (Pre20S) und der Assemblierungsfaktor POMP konnten am ER der Zellen, mit einem verstärkte Auftreten in der Umgebung des Zellkerns in HeLa lokalisiert werden (Abb. 18, A und B). In den Überlagerungen der Bilder colokalisieren die Assemblierungsintermediate und POMP mit dem 20S Proteasom am ER der Zellen. Ein geringer Teil von POMP colokalisiert allerdings nicht mit dem 20S Proteasom, könnte aber trotzdem ER gebunden vorliegen. In den Randbereichen des Cytoplasma, dass vom ER nicht so stark durchdrungen ist, ist vornehmlich cytoplasmatisches 20S Proteasom zu finden und weniger Vorläuferkomplexe bzw. POMP. Im Zellkern konnten keine proteasomalen Vorläuferkomplexe und POMP detektiert werden. Wie in Kapitel 13.1 gezeigt, handelt es sich bei den detektierten Vorläuferkomplexen um rein konstitutive Intermediate.

Weil eine ER Lokalisation für die proteasomalen Vorläuferkomplexe verifiziert werden sollte, wurden Vergleichsaufnahmen mit Immununtereinheiten von IFN γ induzierten HeLa Zellen gemacht. Die Immununtereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ sind hauptsächlich am ER zu finden (Abb. 18 G und K). Die indirekten Immunfluoreszenzen der Immununtereinheiten gleichen den Aufnahmen mit proteasomalen Assemblierungsintermediaten, was für einen ER assoziierten Assemblierungsvorgang sowohl von Immunoproteasomen als auch von konstitutiven Proteasomen spricht. $\beta 1i$ und $\beta 5i$ können aber auch in Zellkern und Cytoplasma der Zellen detektiert werden. Das liegt wahrscheinlich daran, dass nach 24h IFN γ Stimulation bereits viele maturierte Immunoproteasomen vorliegen und diese auch im Zellkern und Cytoplasma zu finden sind (Brooks *et al.*, 2000b).

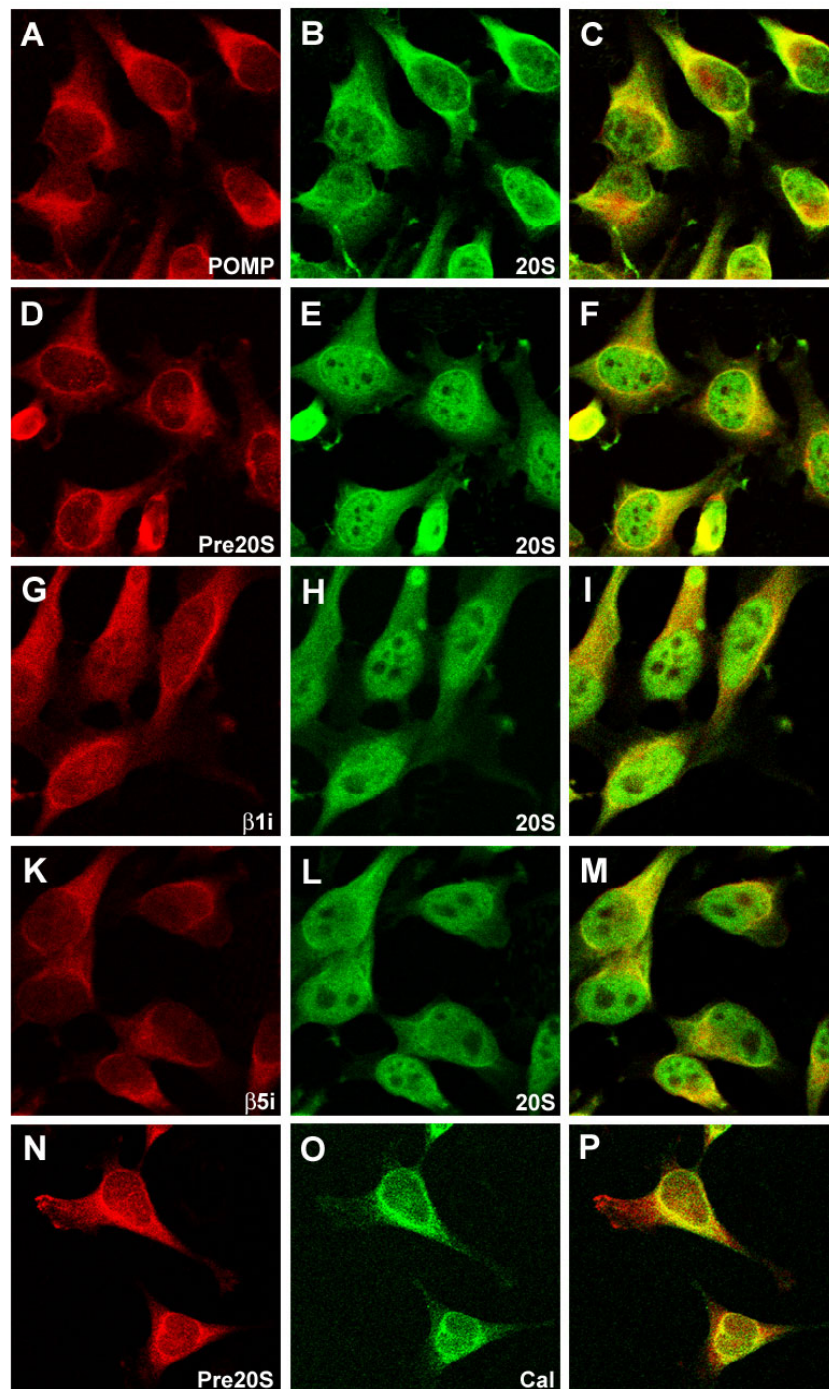


Abb. 18 Aufnahmen indirekter Immunfluoreszenzen von HeLa Zellen durchgeführt mit gegen Assemblierungsintermediate (Pre20S), POMP, $\beta 1i$ und $\beta 5i$ gerichteten Antikörpern. Um die Lokalisation zu verifizieren wurden die Zellen gleichzeitig mit gegen das 20S Proteasom oder Calnexin gerichteten Antikörpern gefärbt. Von allen Aufnahmen sind Überlagerungen gemacht worden um Colokalisationen sichtbar zu machen.

Damit immunzytochemisch eine ER Lokalisation bewiesen werden konnte, wurden indirekte Immunfluoreszenzen von Calnexin und dem Vorläuferkomplex durchgeführt und diese Aufnahmen überlagert. Es gibt eine Konzentration von Assemblierungsintermediaten des 20S Proteasoms an den um den Kern liegenden ER Membranen, wie die Colokalisation mit Calnexin zeigt, während in den Bereichen nahe der Plasmamembran kaum Assemblierungsintermediate zu finden sind (Abb. 18 N-P).

Um auszuschließen, dass es sich um eine für HeLa Zellen spezifische Lokalisation handelt, wurden indirekte Immunfluoreszenzen auch mit der primären humanen Fibroblastenzelllinie CRL2429 angefertigt (Abb. 19). Für den proteasomalen Vorläuferkomplex und POMP konnte eine sehr ähnliche Lokalisation in den Zellen beobachtet werden. Das 20S Proteasom hingegen zeigte auch hier die charakteristische ubiquitäre Verteilung, allerdings mit einer noch stärkeren Fokussierung im Zellkern als bei HeLa Zellen. Auch die Zellkerne der primären Zellen sind jedoch frei von proteasomalen Vorläuferkomplexen und POMP und es findet eine Anreicherung von Assemblierungsintermediaten in der Kernumgebung und eine Verteilung über das ER statt.

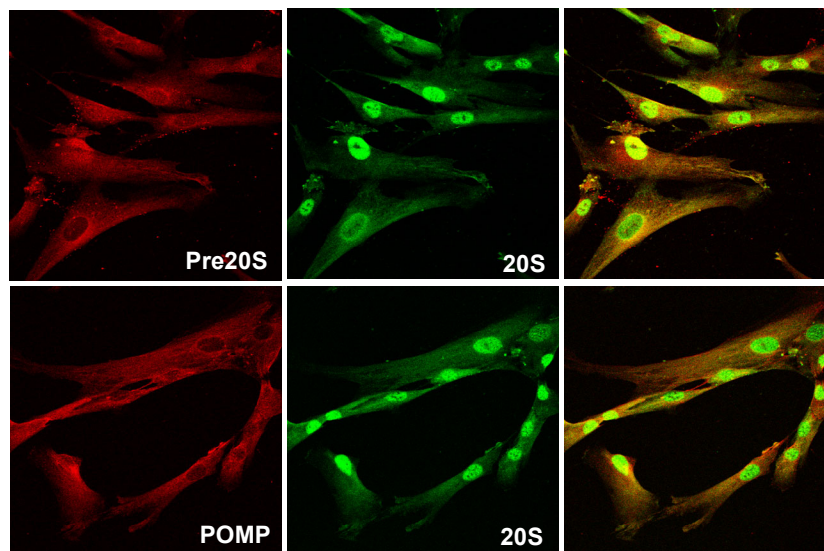


Abb. 19 Aufnahmen indirekter Immunfluoreszenzen von CRL2429 Zellen, die mit Antikörpern gegen Assemblierungsintermediate und POMP gerichtet, gefärbt wurden. Dabei wurden Gegenfärbungen mit einem gegen das 20S Proteasom gerichteten Antikörper angefertigt.

14.3 Zellfraktionierung und Detektion von Biogenesemarkern in HeLa Zellen

Um die in den Immunfluoreszenzaufnahmen gemachten Beobachtungen biochemisch zu verifizieren, wurden Fraktionierungsexperimente mit HeLa Zellen durchgeführt. Als Marker für Assemblierungsintermediate dienten das Assemblierungsprotein POMP und die Proformen der katalytisch aktiven β -Untereinheiten, die im Immunoblot detektiert werden können. Damit eine Aussage über die Menge an Assemblierungsmarkern in den Fraktionen getroffen werden kann, wurden gleiche Mengen der jeweiligen maturierten Untereinheit aufgetragen. So kann die Menge der reifen Proteasomen zu der Menge der Vorläuferkomplexen in Relation gesetzt werden.

Zur Isolation einer Mikrosomenfraktion wurden die Zellen mit Hilfe eines Potters aufgeschlossen und die Mikrosomen durch differentielle Zentrifugation angereichert. Der Überstand aus dem ersten Zentrifugationsschritt wurde noch einmal bei 100 000 g zentrifugiert und enthielt die cytoplasmatische Fraktion. Um eine möglichst große Menge Mikrosomen zu erzeugen und vor allem auch das eng um den Zellkern liegende ER zu lösen, sind viele Hübe mit einem Potter vorteilhaft. Jedoch zeigte die Western Blot Analyse, dass die Assemblierungsintermediate durch häufiges Pottern vom ER abgesichert werden und in die cytoplasmatische Fraktion diffundieren (Abb. 20a). Somit musste eine Balance gefunden werden, um ausreichend Vorläuferkomplexe enthaltende Mikrosomen zu gewinnen, ohne zu viele Komplexe abzuscheren. Für die Mikrosomenpräparation wurden 10-15 Hübe mit dem Potter durchgeführt.

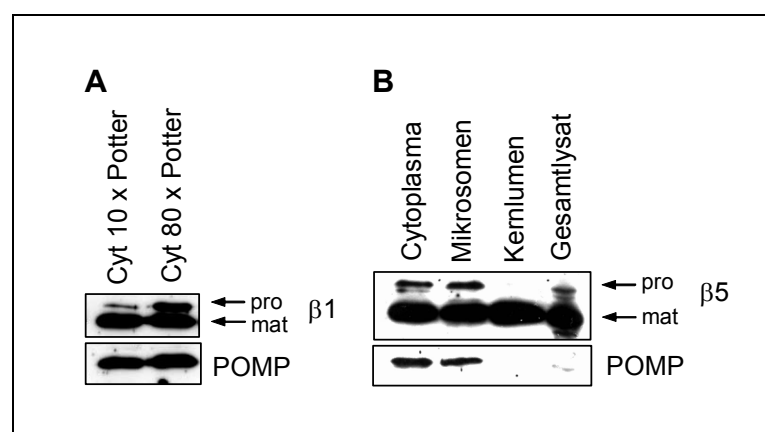


Abb. 20 Western Blot Analyse der Zellfraktionierungsexperimente von HeLa Zellen: A Cytoplasmatische Überstände nach unterschiedlich häufigem Pottern und Detektion von (Pro) $\beta 1$ und POMP. B Detektion von (Pro) $\beta 5$ und POMP in unterschiedlichen subzellulären Zellfraktionen. Cyt = Cytoplasma; 10 x = 10 Hübe

Damit ein möglichst reines Kernlumen mit geringer Verunreinigung durch die kernumgebenden Vorläuferkomplexe gewonnen wurde, wurden für die Kernlumenpräparation 80 Hübe mit dem Potter ausgeführt. Proformen der katalytischen β -Untereinheiten fanden sich in der cytoplasmatischen Fraktion und in der Mikrosomenfraktion, aber nicht im Kernlumen. Die immunzytochemischen Experimente zeigten eine nahezu vollständige Assoziation von proteasomalen Vorläuferkomplexen mit dem ER. Auch die Fraktionierungsexperimente zeigten eine Anreicherung von Proformen und POMP in Fraktionen präparierter Mikrosomen. Durch den mechanischen Stress während des Zellaufschlusses diffundierten allerdings viele Vorläuferkomplexe vom ER, so dass auch im Cytoplasma größere Mengen an Proformen und POMP zu detektieren werden konnten (Abb. 20b). Im Kernlumen sind bei gleicher Menge von maturierter Proteasomenuntereinheit keine Proformen und POMP detektierbar, womit sich auch in diesen Experimenten bestätigt, dass keine proteasomalen Vorläuferkomplexe im Zellkern von humanen Zellen zu finden sind, wie es zuvor in den Immunfluoreszenzstudien beobachtet werden konnte (s. Kap 14.2).

14.4 „floatation“-Experimente mit Mikrosomen und Biogenesintermediaten

Bei der Anreicherung durch differentielle Zentrifugation kann nicht von einer reinen Mikrosomenfraktion ausgegangen werden, weil durch den 100 000 g Zentrifugationsschritt am Ende der Präparation auch viele große Komplexe abzentrifugiert werden. Deshalb wurden „floatation“-Experimente in Saccharosegradienten durchgeführt. Dazu wurden Mikrosomen enthaltende Zellextrakte in ein 2,0 M Saccharosekissen eingebettet und mit einem Saccharosegradienten von 2,0 bis 1,0 M überschichtet. Die Proben wurden für 6 Stunden bei 100 000 g zentrifugiert und der Saccharosegradient mit der Pipette in 0,5 ml Schritten fraktioniert. Mikrosomen sollten sich bei einer Saccharosekonzentration von etwa 1,2 M sammeln. Für die „floatation“-Experimente kann angenommen werden, dass nur ER assoziierte Komplexe mit den Mikrosomen zusammen im Saccharosegradienten aufsteigen.

Die aus den Gradienten gewonnenen Fraktionen wurden in der Western Blot Analyse auf die drei katalytischen Untereinheiten und POMP hin untersucht (Abb. 21). Um die ER enthaltenen Fraktionen zu detektieren wurde als Marker das integrale ER Membran Protein Calnexin verwendet. Es konnten die Proformen der drei katalytischen konstitutiven

Untereinheiten und POMP in den ER-haltigen Fraktionen detektiert werden. Auch maturierte Untereinheiten konnten in den isolierten ER Fraktionen gefunden werden, jedoch ist bekannt, dass ein Teil der Proteasomenpopulation einer Zelle immer mit dem ER assoziiert vorliegt (Brooks *et al.*, 2000b).

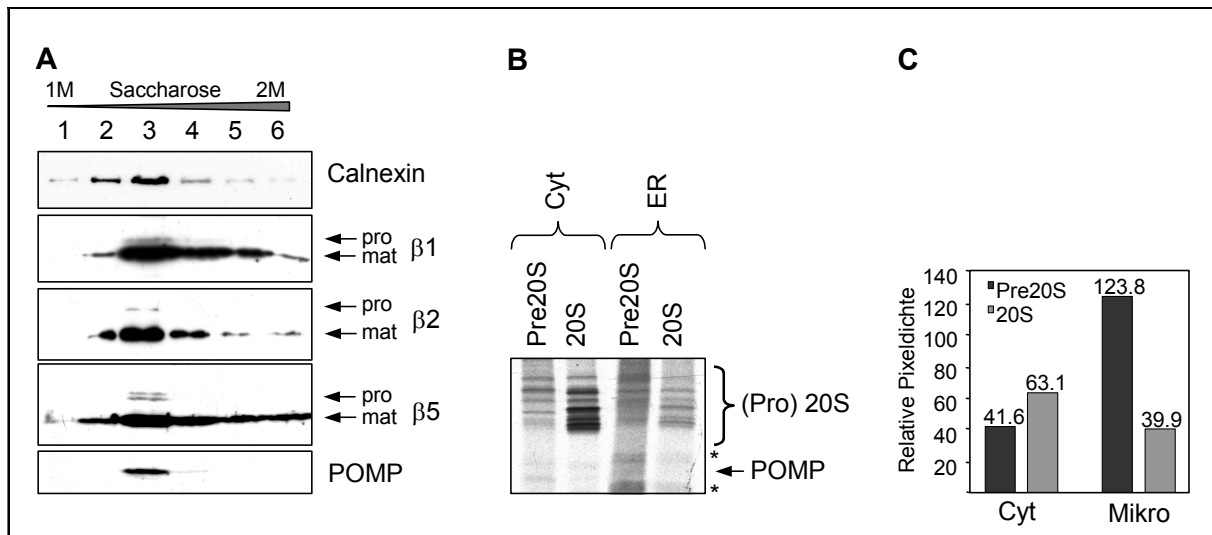


Abb. 21 A Western Blot Analyse von Fraktionen aus einem Gradienten eines „floatation“-Experiments. Calnexin wurde als ER Marker gewählt, um Mikrosomen enthaltende Fraktionen zu identifizieren. Weiterhin wurden diese Fraktionen auf ihren Gehalt an Proformen der katalytisch aktiven Untereinheiten und des Assemblierungsfaktors POMP untersucht. B Immunpräzipitation mit gegen 20S gerichteten Antikörpern Proteasomen und Vorläuferkomplexe (Pre20S) aus Fraktionen radioaktiv markierter HeLa Zellen. Die Zellen wurden mit einem Potter aufgeschlossen und Mikrosomen durch einen Saccharosegradienten isoliert und mit Triton-X 100 solubilisiert. Die gleiche Menge an Radioaktivität wurde aus beiden Fraktionen eingesetzt, um die Immunpräzipitation durchzuführen. Die Auftrennung erfolgte auf einem SDS-Gel und die Detektion mittels Autoradiographie. C Densitometrische Auswertung der in B dargestellten Daten. Cyt = Cytoplasma; Mikro = Mikrosomen; * = nicht identifizierbare Banden

Die Präsenz der proteasomalen Assemblierungsmarker an durch „floatation“-Experimente gewonnenen Mikrosomen bestätigt eine Assoziation von Vorläuferkomplexen des 20S Proteasoms an den ER-Membranen von HeLa Zellen und steht in sinnvoller Übereinstimmung zu den Immunfluoreszenzaufnahmen und Zellfraktionierungsexperimenten.

Um den 13S Komplex auch als ER assoziierten Vorläuferkomplexe nachzuweisen, wurden HeLa Zellen radioaktiv markiert und ein Mikrosomen-„floatation“-Experiment durchgeführt. Die aufgestiegenen Mikrosomen wurde mit Triton-X 100 aufgelöst und eine

Immunpräzipitation aus der im 2,0 M Saccharosekissen verbliebenen Fraktion und der mikrosomalen Fraktion mit dem gegen Pre20S gerichteten Antikörper und einem Antikörper gerichtet gegen das 20S Proteasom durchgeführt. Die Komplexe wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch analysiert (Abb. 21b). Sowohl 20S Proteasomen als auch Biogeneseintermediate konnten aus beiden Fraktionen präzipitiert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass zumindest Anteile der Assemblierungsintermediate durch die Scherkräfte während der Homogenisation mit einem Potter vom ER abgesichert wurden und in der cytoplasmatischen Fraktion wieder zu finden sind.

Da gleiche Mengen an radioaktivem Material der einzelnen Fraktionen eingesetzt wurden, kann eine Aussage über die Verhältnisse von Vorläuferkomplexen zu 20S Proteasomen in den beiden Fraktionen gemacht werden. Dazu wurden die Bandenmuster densitometrisch analysiert (Abb. 21c). Demnach ergibt sich im Cytoplasma ein Verhältnis von ca. 1,5 : 1 (20S Proteasom : Assemblierungsintermediate) und an Mikrosomen ein umgekehrtes Verhältnis von ca. 1 : 3 (20S Proteasomen : Assemblierungsintermediate). Damit ist eine deutliche Anreicherung von Biogeneseintermediaten gegenüber 20S Proteasomen am ER zu erkennen, wodurch die immuncytochemischen Daten unterstützt werden.

14.5 Sensitivität der Assoziation von Vorläuferkomplexen an Membranen durch POMP Entzug und Magnesium-Ionen Mangel

Damit eine genauere Aussage über die Bedingungen für eine Assoziation des Vorläuferkomplexes mit dem ER getroffen werden kann, wurde die Interaktion mit dem ER nach einer Depletion von POMP durch siRNA beziehungsweise nach dem Entzug von Magnesium-Ionen untersucht. Wie in Kapitel 12.4 bereits gezeigt wurde, assoziiert POMP mit einem möglichen α -Ring und begleitet den Assemblierungsprozess von 20S Proteasomen wahrscheinlich bis zur endgültigen Maturierung (Heinemeyer *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 1998). Daher stellt sich die Frage, ob eine Assoziation von proteasomalen Vorläuferkomplexen auch während einer Depletion von POMP mit dem ER stattfindet. Zumindest ein Dimerisierungsprozess zweier Halbproteasomen-Vorläuferkomplex könnte unterbunden sein, da dem homologen Protein in *S. cerevisiae* offenbar eine entscheidende Rolle während dieses Prozesses zukommt (Heinemeyer *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2004).

Die Zellen wurden durch „freeze/thaw“-Zyklen aufgeschlossen und alle Zelltrümmer einschließlich der Membranen bei 100 000 g pelletiert. Die Membranen wurden mit Triton-X 100 solubilisiert und der Überstand und die aus dem Pellet gewonnene Fraktion in der Western Blot Analyse auf Proformen der katalytischen β -Untereinheiten, $\beta 1$ und $\beta 5$, sowie POMP untersucht (Abb. 22). Dabei wurden die Proben auf gleiche Mengen an maturiertem $\beta 5$ (reife Proteasomen) normiert, um eine Aussage über die Relationen zwischen gebundenen und ungebundenen Vorläuferkomplexen treffen zu können. Bei der Zentrifugation von Lysaten unbehandelter Zellen in magnesiumhaltigem Puffer pelletieren die Proformen der katalytischen β -Untereinheiten, hier gezeigt für $\beta 1$ und $\beta 5$, sowie POMP. Während die Proformen nahezu vollständig im Pellet zu finden sind, ist maturiertes $\beta 1$ bzw. $\beta 5$ ($\beta 1$ nicht gezeigte Daten) in beiden Fraktionen in gleichen Mengen zu finden.

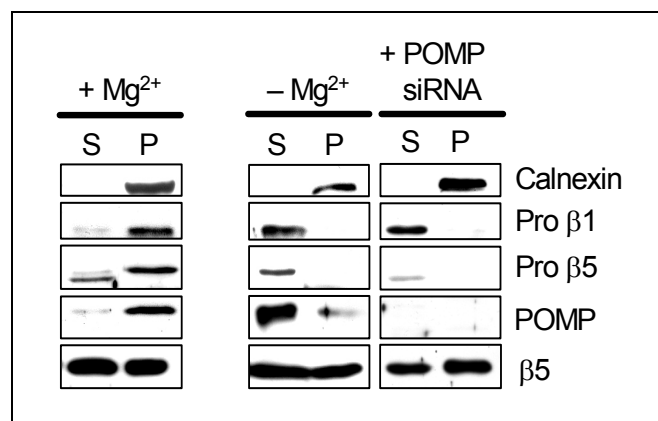


Abb. 22 HeLa Zellen wurden in lösliche Proteinbestandteile (S) und unlösliche bzw. gebundene Bestandteile (P) fraktioniert und die Proformen katalytischer konstitutiver Untereinheiten und POMP mittels einer Western Blot Analyse untersucht. Weitere Fraktionierungsexperimente wurden in Mg²⁺ freiem Puffer und mit POMP siRNA behandelten Zellen durchgeführt (siRNA Transfektion durch D. Ludwig ausgeführt). Als Referenz wurde maturiertes $\beta 5$ gewählt.

Wird dem Lysepuffer kein Magnesium zugesetzt, sammeln sich die Proformen und POMP im Überstand und pelletieren nicht mehr. Das bedeutet, dass nicht nur der Dimerisierungsprozess unterbunden wird, sondern die Wechselwirkung des Komplexes mit dem ER derart gestört wird, dass keine Assoziation mehr stattfinden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre der Zerfall des Komplexes, so dass die einzelnen Untereinheiten vom ER dissoziieren. Es findet ebenfalls

keine Assoziation der katalytischen Untereinheiten mit dem ER nach der Behandlung der Zellen mit POMP siRNA für 24 Stunden statt. Es wurde bereits gezeigt, dass POMP die $\beta 5$ Untereinheit in den Vorläuferkomplex rekrutiert. Weiterhin hat eine Herabregulation von POMP eine Abnahme der Proteasomenbiogenese zur Folge und leitet damit die Apoptose der Zellen ein (Heink *et al.*, 2005). Daher ist davon auszugehen, dass nach der POMP Depletion keine Komplexbildung mehr stattfinden kann und dadurch Proformen der katalytischen β -Untereinheiten nicht mehr in den membranassoziierten Komplexen vorliegen. POMP kommt daher eine Schlüsselrolle während des ER-assoziierten Assemblierungsvorgangs zu, indem es die Assoziation der Proformen der katalytischen Untereinheiten mit dem ER assoziierten Komplex vermittelt.

Da ein Zerfall des Vorläuferkomplexes nach dem Entzug von Magnesium möglich ist, wurden Immunpräzipitation zur Untersuchung der Komplexstabilität mit magnesiumdepletierten Puffern durchgeführt.

14.6 Beständigkeit der 13S Vorläuferkomplex-Struktur nach Magnesiumentzug

Da 20S Proteasomen zur Stabilisierung des Komplexes mit Magnesium-Ionen komplexieren (Groll *et al.*, 1997), könnten nach dem Entzug von Magnesium die Vorläuferkomplexe destabilisiert werden und zerfallen. Das hätte eine Vereinzelung der Untereinheiten zur Folge und dadurch den Verlust der ER Assoziation. Um einen Zerfall der Komplexe auszuschließen, wurden Immunpräzipitationen mit dem gegen Pre20S gerichteten Antikörper aus Gesamtzelllysaten durchgeführt und diese mit magnesiumhaltigen bzw. EDTA enthaltenden, magnesiumfreien Puffern gewaschen. Danach wurden die Komplexe in einer SDS-PAGE aufgetrennt und angefärbt (Abb. 23a). Es konnte in der Coomassie-Färbung kein Unterschied in der Zusammensetzung der 13S Vorläuferkomplexe ausgemacht werden. Daher scheint zumindest die Komplexzusammensetzung durch Magnesiummangel nicht beeinflusst zu werden. Auch POMP kann in den Komplexen detektiert werden, so dass die Dissoziation nach Magnesium-Ionen-Entzug einem anderen Mechanismus unterliegen muss, der von der POMP Depletion unabhängig ist. Es müssen Wechselwirkungen durch den Ionen-Entzug so gestört werden, dass die Vorläuferkomplexe sich im ganzen vom ER lösen.

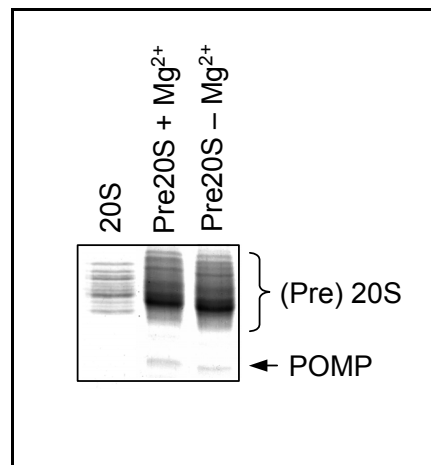


Abb. 23 Coomassie gefärbtes SDS-Gel einer Immunpräzipitation, die mit Antikörpern gegen 20S Proteasomen und Assemblierungsintermediate (Pre20S) gerichtet aus Gesamtzelllysaten von HeLa Zellen durchgeführt wurden. Die proteasomalen Vorläuferkomplexe wurden während der Immunpräzipitation mit magnesiumdepletierten oder magnesiumhaltigen Puffern gewaschen.

14.7 POMP assoziiert quantitativ mit Hundepankreasmikrosomen (HPM)

Das Assemblierungsprotein POMP konnte sowohl in den indirekten Immunfluoreszenzen als auch in den biochemischen Experimenten immer zu einem sehr großen Anteil ER assoziiert vorgefunden werden (s. Kap. 14.2 – 14.5). Da das für eine limitierende Rolle von POMP während des Biogeneseprozesses (Heink *et al.*, 2005) oder auch für eine assoziationsvermittelnde Rolle sprechen könnte, wurde eine direkte Assoziation von POMP mit Mikrosomen untersucht. Dazu wurde POMP im Retikulozytenlysat in Gegenwart von Hundepankreasmikrosomen (HPM) translatiert und radioaktiv markiert. Es wurden 1-3µl HPM zugesetzt, um eine quantitative Assoziation zu überprüfen. Als Kontrolle diente das Protein Luziferase, das keine Affinität zu Mikrosomen besitzt.

Die Mikrosomen wurden durch ein 0,5 M Saccharosekissen abzentrifugiert und mehrfach gewaschen. Dann wurde das Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 0,05 % des Überstandes und das Pellet einer SDS-PAGE unterzogen und die markierten Proteine über Autoradiographie detektiert (Abb. 24a). Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und die Menge an 1µl Mikrosomen gebundenes Protein als 1 gesetzt (Abb. 24b). Die anderen Banden wurden relativ zu dieser ausgewertet. Für das Kontrollprotein Luziferase konnte zwar eine schwache Bande, aber keine Steigerung der Luziferase-Assoziation durch Zugabe

größerer Mengen Mikrosomen detektiert werden. Für POMP konnte eine klare quantitative Assoziation festgestellt werden, da die Menge gebundenen und detektierbaren POMP mit der Menge an zugesetzten Mikrosomen direkt korreliert. POMP interagiert also mit Proteinen oder Phospholipiden der ER Membranen, die in definierten Mengen vorhanden sind. Ob es sich dabei um proteasomale Proteine bzw. Komplexe, andere Proteine oder Lipide handelt, ist aus diesen Ergebnissen nicht abzuleiten.

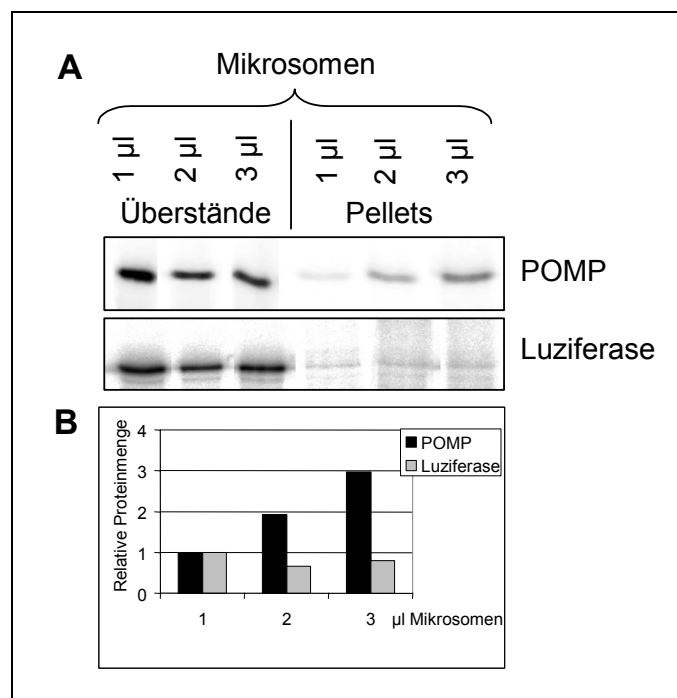


Abb. 24 A POMP wurde im TnT-Retikulozytenlysat-Expressionssystem in Gegenwart von 1-3 µl Mikrosomen translatiert. Die Mikrosomen wurden abzentrifugiert, gewaschen und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Mit den Proben wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und das Gel anschließend autoradiographisch ausgewertet. Als Expressionskontrolle wurden je 0,4 µl des Überstandes aufgetragen. Als Kontrollprotein für keine Wechselwirkungen mit Membranen wurde Luziferase mitgeführt. In den mikrosomalen Pellets geht ein deutlicher Anstieg von POMP mit zunehmender Menge an Membranen einher. B Densitometrische Auswertung von A. Die Pixeldichte bei 1 µl Mikrosomen wurde für beide Proteine 1 gesetzt und alle anderen relativ dazu ausgewertet.

14.8 Detektion einer membraninteragierenden Proteindomäne von POMP und Charakterisierung einer Membran-Interaktion bzw. Integration

In bezug auf POMP keine Aussage über eine Assoziation oder Verankerung in der ER Membran aufgrund der bisher gewonnenen Daten gemacht werden konnte, wurden weitere Experimente mit *in vitro* translatiertem radioaktiv markiertem POMP und HPM durchgeführt (Abb. 25).

Eine posttranslationale Assoziation von POMP mit Mikrosomen wurde untersucht. Dafür wurde dem Reaktionsmix nach erfolgter Translation Cycloheximid (CHX) zugefügt und dann die Membranen zugegeben. Da POMP auch unter diesen Bedingungen in der mikrosomalen Fraktion detektierbar ist, erfolgt auch eine Interaktion von bereits translatiertem POMP mit HPMs. Um eine Verankerung oder Integration von POMP in den Lipidschichten zu untersuchen, wurden mit POMP assoziierte Mikrosomen unter 2,5 M Harnstoffbedingungen bzw. alkalischen Bedingungen bei pH 11,0 gewaschen, wodurch periphere Membranproteine im Regelfall dissoziieren. POMP konnte nach dieser Behandlung kaum in den mikrosomalen Pellets detektiert werden, was für eine Assoziation und keine Integration spricht. Zum Nachweis einer Interaktion von POMP mit integralen Membranproteinen oder Phospholipiden der Membran wurden Liposomen erzeugt und den Translationsansätzen zugegeben. POMP assoziiert auch mit Liposomen, während das Kontrollprotein Luziferase keine Affinität aufweist.

Um eine interagierende Proteinsequenz von POMP weiter eingrenzen zu können, wurden verkürzte Varianten von POMP hergestellt (Abb. 25 unten). Es wurden überlappende Fragmente des C- bzw. N-Terminus kloniert, die zusammen die gesamte Proteinsequenz abdecken. Keines dieser beiden Konstrukte konnte unter oben genannten Versuchsbedingungen mit Mikrosomen assoziiert gefunden werden. Auch ein Fragment, das eine Aminosäuresequenz aus der Mitte des Proteins beinhaltet und somit Teile beider Konstrukte, konnte nicht an Mikrosomen gebunden detektiert werden (nicht gezeigte Daten). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass nur ein vollständiges POMP Molekül eine Konformation einnehmen kann, die zu einer Interaktion mit Membranen führt und es keine kurzen Sequenzabschnitte im Protein gibt, die eine Assoziation vermitteln könnten.

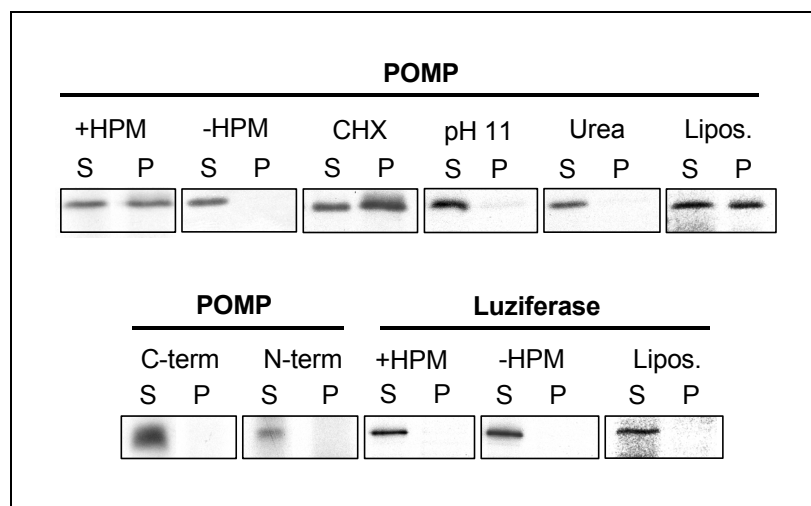


Abb. 25 Es wurden Untersuchungen der Interaktion von POMP mit HPM unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden Expressionsansätze mit HPM inkubiert und die Mikrosomen abzentrifugiert. Die Mikrosomen wurden unter unterschiedlich stringenten Bedingungen inkubiert und gewaschen. Ein Teil des Überstandes (S) und die komplette Mikrosomenfraktion (P) wurden auf SDS Gele geladen und die Proteine autoradiographisch detektiert. Als Kontrollprotein diente Luziferase, das nicht mit Mikrosomen interagiert. CHX = Cycloheximid, Urea = Harnstoff, Lipos = Liposomen, term = terminal

Die *in vivo* gemachten Beobachtungen für POMP konnten mit diesen Experimenten bestätigt werden. POMP assoziiert mit ER Membranen, besitzt aber keine integrierenden oder verankernden Sequenzen, wodurch sich auch die Sensitivität der ER Assoziation von POMP gegenüber Scherkräften und Pufferbedingungen erklären lassen.

14.9 Assoziation von POMP an Mikrosomen unter Hochsalzbedingungen

In vivo konnte bereits gezeigt werden, dass die Assoziation von POMP mit Membranen instabil gegenüber der Einwirkung von Scherkräften ist. Daher wurde die Stabilität der Assoziation von POMP unter Hochsalzbedingungen untersucht. Dafür wurden ER-haltige Fraktionen aus den Gradienten des „floatation“-Experimentes (siehe Abschnitt 3.4) verwendet, die Proben verdünnt und die Mikrosomen durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde mit Puffern und einer ansteigenden KCl Konzentration gewaschen und jeweils der gesamte Waschschrift bzw. das Pellet einer SDS-PAGE unterzogen. Zur Kontrolle wurde wieder Calnexin verwendet, dass als integrales Membranprotein nicht durch hohe Salzbedingungen extrahiert

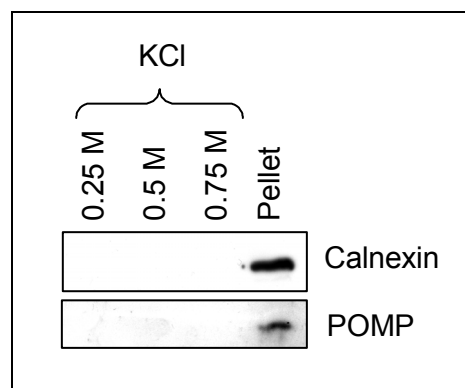


Abb. 26 Es wurde eine Untersuchung der Salzstabilität von POMP an Mikrosomen durchgeführt. Dazu wurden isolierte Mikrosomen (s. Kap. 11.14.4) abzentrifugiert und mit ansteigenden Konzentrationen KCl gewaschen. Die Überstände und das Pellet wurden einer SDS-PAGE unterzogen. In der Western Blot Analyse wurde zur Detektion der Membranfraktion Calnexin gewählt. Ein weitere Western Blot Analyse mit den gleichen Fraktionen wurde mit POMP durchgeführt.

wird (Abb. 26). Daher ist Calnexin nur im Pellet zu finden und nicht in den KCl-haltigen Waschlösungen. Für POMP konnte ebenso eine salzstabile Assoziation nachgewiesen werden, was zumindest eine unspezifische Interaktion mit Membranen unter gegebenen Versuchsbedingungen unwahrscheinlich macht. Daher ist die ER Assoziation von POMP *in vivo* zwar sensibel gegenüber Scherkräften jedoch nach Isolierung der mikrosomalen Membranen immer noch sehr stabil unter Hochsalzbedingungen.

14.10 Assoziation *in vitro* erzeugter Komplexe mit HPM

Bisher konnte eine ER Lokalisation für Biogeneseintermediate des 20S Proteasoms *in vivo* und für das Biogeneseprotein POMP eine Assoziation an HPM *in vitro* beschrieben werden. Im ersten Ergebnisabschnitt (s. Kap. 12) wurde gezeigt, dass im Retikulozytenlysat 13S Vorläuferkomplexe erzeugt werden können. Aus diesem Grund wurde die Assoziation dieser *in vitro* erzeugten 13S Vorläuferkomplexe mit HPM untersucht.

Es wurden Gradientenfraktionen vereint, die einen α -Ring (# 7-9) beziehungsweise einen 13S Vorläuferkomplex (#11-13) enthalten. Diese Fraktionen wurden mit HPM inkubiert, die Mikrosomen abzentrifugiert und gewaschen. Zur Kontrolle, dass es kein Präzipitat in

den Proben gibt, wurden gleiche Mengen Probe ohne Mikrosomen mitgeführt. Die Pellets wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und in einer SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie analysiert (Abb. 27). Es konnten keine Komplexe im Pellet von Proben ohne Mikrosomen gefunden werden,

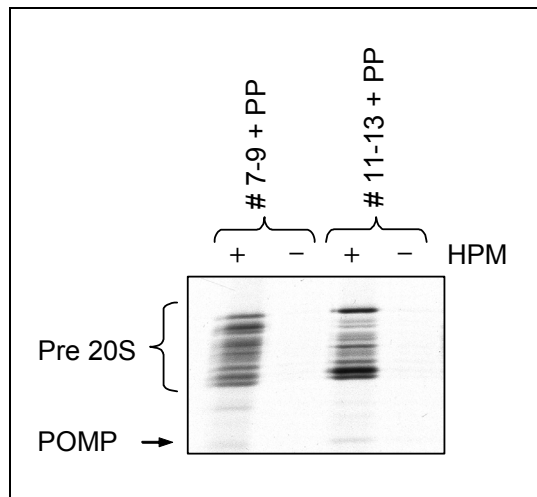


Abb. 27 Es wurden Komplexe enthaltende Fraktionen aus den in Kapitel 12.2 gezeigten Gradienten gepoolt und mit Mikrosomen inkubiert. Um eine Präzipitation der Komplexe ohne HPM auszuschließen wurden gleiche Mengen ohne Mikrosomen mitgeführt. Die Mikrosomen wurden abzentrifugiert und die Pellets mittels einer SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht.

aber Bandenmuster, die für proteasomale Komplexe sprechen, in den mikrosomalen Pellets detektiert werden.

Das bedeutet, dass auch die *in vitro* erzeugten Vorläuferkomplexe mit Mikrosomen assoziieren.

14.11 Coimmunpräzipitation mit Vorläuferkomplexen assoziierter Proteine

Um mögliche Proteine zu identifizieren, die die Assoziation von POMP und proteasomalen Vorläuferkomplexen mit ER-Membranen unterstützen oder mit dem ER assoziierten Assemblierungsvorgang verbunden sind, wurden Immunpräzipitationen aus cytoplasmatischen und ER angereicherten Extrakten mit gegen POMP gerichteten Antikörper durchgeführt. Aufgrund der Magnesium-Sensitivität wurden die Immunpräzipitationen mit magnesiumhaltigen Puffern durchgeführt. Die erhaltenen Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (Abb. 28).

In der angereicherten ER Fraktion konnte dabei eine Bande bei ca. 130 kDa identifiziert werden, die in der cytoplasmatischen Fraktion nicht in diesen Mengen detektierbar gewesen ist. Da das Protein nur in der ER Fraktion auftritt, könnte es an der ER-Assoziation proteasomaler Vorläuferkomplexe beteiligt sein. Die Proteinbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurde das Protein LRP130 „*leucine-rich protein 130*“ identifiziert. Für dieses Protein wurde in früheren Publikationen eine RNA-Bindungseigenschaft und eine Lokalisation an der äußeren Kernmembran und dem ER beschrieben (Tsuchiya *et al.*, 2004). Daher könnte dieses Protein eine Verknüpfung zwischen der Translation und Assemblierung am ER von proteasomalen Untereinheiten darstellen.

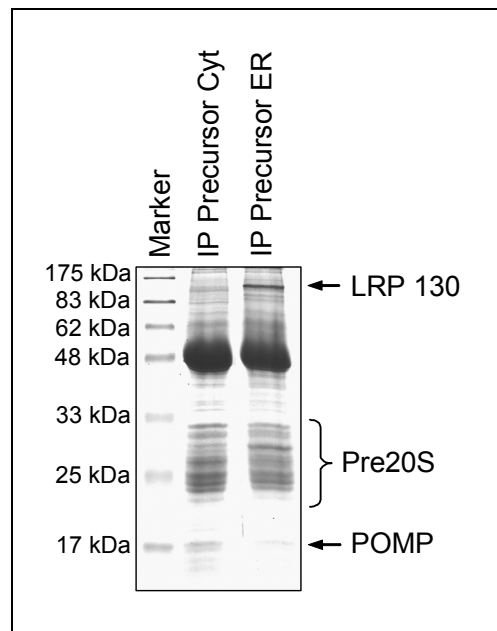


Abb. 28 Coomassie gefärbtes SDS-Gel der mit gegen POMP gerichtetem Antikörper immunpräzipitierten proteasomalen Vorläuferkomplexe aus cytoplasmatischen und ER-Proteinen angereicherten Fraktionen. Es ist eine deutliche Anreicherung des Proteins LRP130 in den ER Extrakten zu beobachten. IP = Immunpräzipitation; Cyt = Cytoplasma

Diskussion

Assemblierungsmodelle humaner 20S Proteasomen basieren bisher zum größten Teil auf Untersuchungen an prokaryotischen Organismen oder *S. cerevisiae*. Um den Biogenesevorgang des 20S Proteasoms im humanen System zu untersuchen wurden Assemblierungsvorgänge in dieser Arbeit in *in vitro* und *in vivo* Experimenten untersucht.

15 *In vitro* Formierung von Assemblierungsintermediaten

Durch gleichzeitige Expression aller proteasomalen Untereinheiten und der akzessorischen Proteine PAC1, PAC2 und POMP erfolgte in einem Retikulozytenlysat-Expressionssystem ein Assemblierungsprozess bis zum 13S Vorläuferkomplex (α_{1-7} ; Pro β 2, β 3, β 4, Pro β 6). Ein Einbau der letzten β -Untereinheiten und damit ein vollständiger Zusammenbau von 20S Proteasomen gelang jedoch in keinem der gewählten Ansätze. Auch eine Zugabe von Gesamtzelllysat aus HeLa Zellen, Hundepankreasmikrosomen (HPM) oder ER-Proteinextrakten aus HeLa Zellen aufgrund der ER Lokalisation von Assemblierungsintermediaten (s. Kap. 14.2-14.5) konnte kein Voranschreiten des Assemblierungsprozesses über einen 13S Vorläuferkomplex hinaus bewirken (nicht gezeigte Daten). Daher ist davon auszugehen, dass weitere evt. kurzlebige Proteine oder Membranproteine, die außerhalb der Lipidschicht ihre Struktur verlieren, benötigt werden. Eine Regulation könnte aber auch durch andere Signale wie zum Beispiel der Modifikation einer oder mehrerer Untereinheiten vermittelt werden. Eine mögliche posttranslationale Modifikation wäre eine Phosphorylierung. Dass Phosphorylierungen den Assemblierungsprozess des 20S Proteasoms begleiten könnten, ist schon früher diskutiert worden (Tanaka *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1990). Yang *et al.* (1995) beschrieben, dass der 13S Vorläuferkomplex (hier als 15S Komplex bezeichnet) nicht phosphoryliert vorliegt, jedoch eine Behandlung der Zellen mit Phosphataseinhibitoren zu einer leicht verzögerten Verwendung von Assemblierungsintermediaten führt. Es wurde auch eine Regulation der Assemblierung des 26S Proteasoms durch Phosphorylierung in *S. cerevisiae* gezeigt, die eine Assoziation von 19S Regulator und 20S Proteasom regulieren könnte (Satoh *et al.*, 2001). Eine Phosphorylierung oder Dephosphorylierung proteasomaler Untereinheiten oder am Assemblierungsprozess beteiligter Proteine könnte für das Voranschreiten vom 13S zum 20S

Proteasom essentiell sein. Eine Möglichkeit wäre die Phosphorylierung der humanen $\alpha 7$ Untereinheit (Bose *et al.*, 2004).

Bei den nicht in den 13S Vorläuferkomplex eingebauten Untereinheiten handelt es sich neben $\beta 5$ auch um die beiden β -Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 7$ mit C-terminalen Verlängerungen, die die auffälligsten *trans* Interaktionen in Richtung des im 20S Proteasom gegenüberliegenden β -Ring aufweisen (Unno *et al.*, 2002). Dass die C-terminalen Verlängerungen von $\beta 1$ und $\beta 7$ eine Auswirkung auf die Effektivität des Dimerisierungsprozesses haben könnten, wurde anhand einer Deletionsstudie in *S. cerevisiae* gezeigt (Ramos *et al.*, 2004). Die Deletion des C-Terminus von $\beta 7$, der im Proteasom von *S. cerevisiae* und des Rindes Interaktionen mit den gegenüberliegenden Untereinheiten $\beta 1'$ und $\beta 2'$ eingeht, führte in *S. cerevisiae* zu einem gestörten Dimerisierungsprozess und einer Akkumulation von Halbproteasom-Vorläuferkomplexen. Um eine frühzeitige Dimerisierung von zwei Halbproteasom-Vorläuferkomplexen zu unterbinden, könnte ein Regulationsmechanismus existieren, der den Einbau der späten Untereinheiten verhindert. Das könnte zum einen eine Überprüfung des Assemblierungsvorgangs vor dem Einbau der letzten Untereinheiten sein und zum anderen einen Kontrollmechanismus über die Proteasomenanzahl in der Zelle darstellen. Zusätzlich könnte eine frühzeitige Dimerisierung den Einbau einiger früh in die Komplexe inkorporierter Untereinheiten sterisch behindern. Diese Regulation könnte durch Modifikationen, aber auch durch weitere akzessorische oder rein regulatorische Proteine vollzogen werden. Diese postulierten regulatorischen Prozesse könnten *in vivo* von kurzlebigen Proteinen ausgeführt werden, die im Retikulozytenlysat nicht vorliegen.

Neben dem 13S Vorläuferkomplex konnte nur ein weiteres Assemblierungsintermediat im Retikulozytenlysat identifiziert werden, bei dem es sich um einen aus allen sieben α -Untereinheiten und POMP bestehenden Komplex handelt. Da dieser Komplex im nicht denaturierenden Gradientengel etwas unterhalb des 13S Vorläuferkomplexes migriert (s. Abb. 11) ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei diesem Komplex um einen α -Ring handelt. Beide Komplexe migrieren unter nicht denaturierenden Bedingungen bei einem wesentlich größeren Molekulargewicht als anhand ihrer Untereinheitenzusammensetzung erwartet, was an akzessorischen Proteinen oder einem aufgrund von Ladungsexpositionen veränderten Migrationsverhalten im nicht denaturierenden Gradientengel liegen könnte. Auch in anderen Arbeiten gab es widersprüchliche Angaben über das Molekulargewicht proteasomaler

Vorläufer-Komplexe, die durch Superose 6 Filtration beziehungsweise über eine nicht denaturierende Gelelektrophorese ermittelt wurden (Schmidtke *et al.*, 1997). Diese Experimente wurden allerdings mit sehr aufwendig gereinigten Komplexen durchgeführt, wodurch es zur Dissoziation akzessorischer Proteine gekommen sein könnte. Die Sedimentierung im Saccharosegradienten zumindest ist für die in vorangegangenen Arbeiten aus Zellen analysierten und die im Retikulozytenlysat generierten Komplexe vergleichbar (Frentzel *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1997; Schmidtke *et al.*, 1997).

Die Zusammensetzung des α -Ringes konnte in dieser Arbeit nicht weiter überprüft werden. Alle α -Untereinheiten sind jedoch stöchiometrisch in 2D-Gelen detektierbar, so dass nicht davon auszugehen ist, dass sich α -Ringe aus nur der $\alpha 7$ Untereinheit oder den Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 1$ und $\alpha 6$ formiert haben, wie sie von Gerards *et al.* (1997) bei heterologer Expression in *E. coli* auftraten. Die im Retikulozytenlysat entstehenden Komplexe sind in Abbildung 29 schematisch dargestellt.

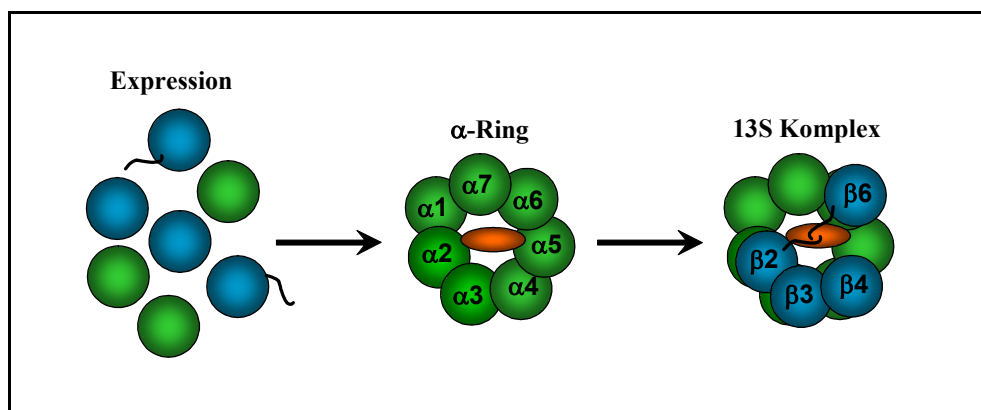


Abb. 29 Schematische Darstellung isolierbarer Komplexe nach Expression aller proteasomalen Untereinheiten und POMP im Retikulozytenlysat-Expressionssystem.

16 Komplexbildung und Reihenfolge des Untereinheiteneinbaus in 20S Proteasomen *in vivo*

Um die Übereinstimmung der *in vitro* generierten Komplexe mit der Situation *in vivo* zu ergründen, wurden *in vivo* Analysen proteasomaler Vorläuferkomplexe in HeLa Zellen angeschlossen, die die Zusammensetzung der Komplexe und eine Reihenfolge des Untereinheiteneinbaus in proteasomale Vorläuferkomplexe determinieren sollten.

Unter den α -Untereinheiten konnte die Untereinheit $\alpha 1$ nach der radioaktiven Markierung von HeLa Zellen bereits nach kurzen Zeitpunkten detektiert werden. Das könnte dafür sprechen, dass $\alpha 1$ die letzte in den 13S Vorläuferkomplex eingebaute und damit den α -Ring schließende Untereinheit darstellt. Ob $\alpha 1$ die Vervollständigung eines existierenden α -Ringes oder die Komplettierung eines 13S Vorläuferkomplexes bewirkt bleibt offen. Wäre $\alpha 1$ die letzte Untereinheit eines α -Ringes müssten die frühen β -Untereinheiten, die in den 2D-Gelen in Abbildung 15 und 16 nicht radioaktiv markiert sind, bereits in der Zelle synthetisiert vorliegen, um mit dem Komplex zu assoziieren. Die Untereinheit $\alpha 1$ könnte dem 13S Vorläuferkomplex auch erst die Inkorporation der späten β -Untereinheiten ermöglichen. Durch die zuvor noch geöffnete Struktur könnte der Assemblierungsprozess der anderen Untereinheiten erleichtert sein. Eine Assemblierung über heterologe Komplexe aus α - und β -Untereinheiten ist auch aufgrund der randomisierten Anordnung einiger α -Untereinheiten in heptameren Ringen bei Expression in *E. coli* in Erwägung zu ziehen (Gerards *et al.*, 1997). Ein weiterer Hinweis auf $\alpha 1$ als ringschließende Untereinheit ist die Schwierigkeit von Hirano *et al.*, diese Untereinheit in den angeblich einen α -Ring enthaltenden Fraktionen *in vivo* zu detektieren. Sowohl in der Coomassie-Färbung als auch in den Western Blot Analysen konnte $\alpha 1$ nur schwach beziehungsweise gar nicht angefärbt werden. In den von ihnen im Retikulozytenlysat generierten und radioaktiv markierten α -Ringgen konnte $\alpha 1$ wiederum identifiziert werden. Das wirft die Frage auf, ob ein α -Ring ein ausschließlich *in vitro* erzeugbares Assemblierungsintermediat darstellt, jedoch *in vivo* die Assemblierung über Komplexe aus α - und β -Untereinheiten vonstatten geht und der α -Ring zu einem späteren Zeitpunkt der 13S Vorläuferkomplexformierung geschlossen wird. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Kurzlebigkeit des α -Ringes *in vivo*, so dass mit den angewandten Mitteln keine Isolierung des α -Ringes möglich ist.

Die Ergebnisse vorangegangener Publikationen zum 13S Vorläuferkomplex sind insofern vorsichtig zu interpretieren, als in den verschiedenen experimentellen Ansätzen nicht immer alle Proteinspots in 2D-Gel Analysen charakterisiert wurden. Bei den Komplexanalysen wurde auch nicht zwischen mit rein konstitutiven und Immunountereinheiten besetzten Vorläuferkomplexen unterschieden (Frentzel *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1997; Schmidtke *et al.*, 1997). Bei der Postulierung der Zusammensetzung des 13S Vorläuferkomplexes durch Nandi

et al. (1997) wurde keine Unterscheidung zwischen Vorläuferkomplexen des konstitutiven und des Immunoproteasoms gemacht. Auch die Möglichkeit gemischter Proteasomen (Dahlmann *et al.*, 2001; Dahlmann *et al.*, 2000; De *et al.*, 2003; Kingsbury *et al.*, 2000) wurde nicht berücksichtigt. In nachfolgenden Publikationen wurden allerdings dem konstitutiven 13S Vorläuferkomplex die sieben α -Untereinheiten und die drei frühen β -Untereinheiten Pro β 2, β 3 und β 4 anhand der Publikation von Nandi *et al.* (1997) zugeordnet (Heinemeyer *et al.*, 2004; Kruger *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1997). Die meisten 13S Vorläuferkomplexe wurden bisher aus murinen Zellen mit einer Basalexpression von Immununtereinheiten isoliert (Frentzel *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1997). Die einzige Arbeit zu humanen 13S Vorläuferkomplexen stammt von Schmidtke *et al.* (1997). Sie isolierten 13S Vorläuferkomplexe aus T2 Zellen, die allerdings mit β 1i transfiziert waren, wodurch Untersuchungen an rein konstitutiven Vorläuferkomplexen nicht möglich waren.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein rein konstitutiver Vorläuferkomplex mittels Immunpräzipitation aus HeLa Zellen isoliert und die Untereinheitenzusammensetzung analysiert. Dieser 13S Vorläuferkomplex besteht aus den postulierten Untereinheiten α_{1-7} , Pro β 2, β 3 und β 4. Zusätzlich sind Pro β 6 und POMP Teil dieses Komplexes. Diese Zusammensetzung entspricht den in Retikulozytenlysat generierten Komplexen. Das bedeutet, dass dem hier isolierten 13S Vorläuferkomplex die zwei β -Untereinheiten mit C-terminal interagierenden Verlängerungen (Pro β 1 und Pro β 7) und die Untereinheit Pro β 5 fehlen.

Der 13S Vorläuferkomplex ist das bisher langlebigste bekannte Assemblierungsintermediat während der Biogenese des 20S Proteasoms. Die Inkorporation der letzten drei β -Untereinheiten und die darauf folgende Dimerisierung sind wahrscheinlich sehr schnell ablaufende Prozesse (Nandi *et al.*, 1997). Durch Experimente mit radioaktiven HeLa Extrakten konnten im Rahmen dieser Arbeit die Untereinheiten identifiziert werden, die am ehesten nach ihrer Synthese in Vorläuferkomplexe eingebaut wurden und dann als erstes im 20S Proteasom radioaktiv markiert erscheinen. Dadurch konnten die Untereinheiten bestimmt werden, die in bereits vorassemblierte Vorläuferkomplexe eingebaut werden, deren Untereinheiten noch nicht radioaktiv markiert waren. Eine weitere Möglichkeit wäre die gleichzeitige Verwendung von markierten und frei im Überschuss vorkommenden unmarkierten Untereinheiten. Dann würde lediglich eine Aussage über den Einbau der Untereinheiten in bezug auf ihre momentane Synthese zutreffen. Jedoch wird davon

ausgegangen, dass proteasomale Untereinheiten, bis auf $\alpha 5$, kaum in größerer Anzahl als monomere Untereinheiten in der Zellen vorkommen (Hendil *et al.*, 1995; Jorgensen und Hendil, 1999). Die Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 7$ konnten in diesen Experimenten als spät in den Halbproteasom-Vorläuferkomplex integrierte Untereinheiten bestätigt werden. Auch die bereits beschriebene kurze Halbwertszeit des $\beta 7$ Propeptids von 10 Minuten in Rattenfibroblasten und dessen schnelle Maturierung sprechen für einen sehr späten Einbau dieser Untereinheit in das 20S Proteasom (Thomson und Rivett, 1996). Ein mögliches Modell des Assemblierungsvorgangs mit akzessorischen Faktoren ist in Abbildung 30 dargestellt.

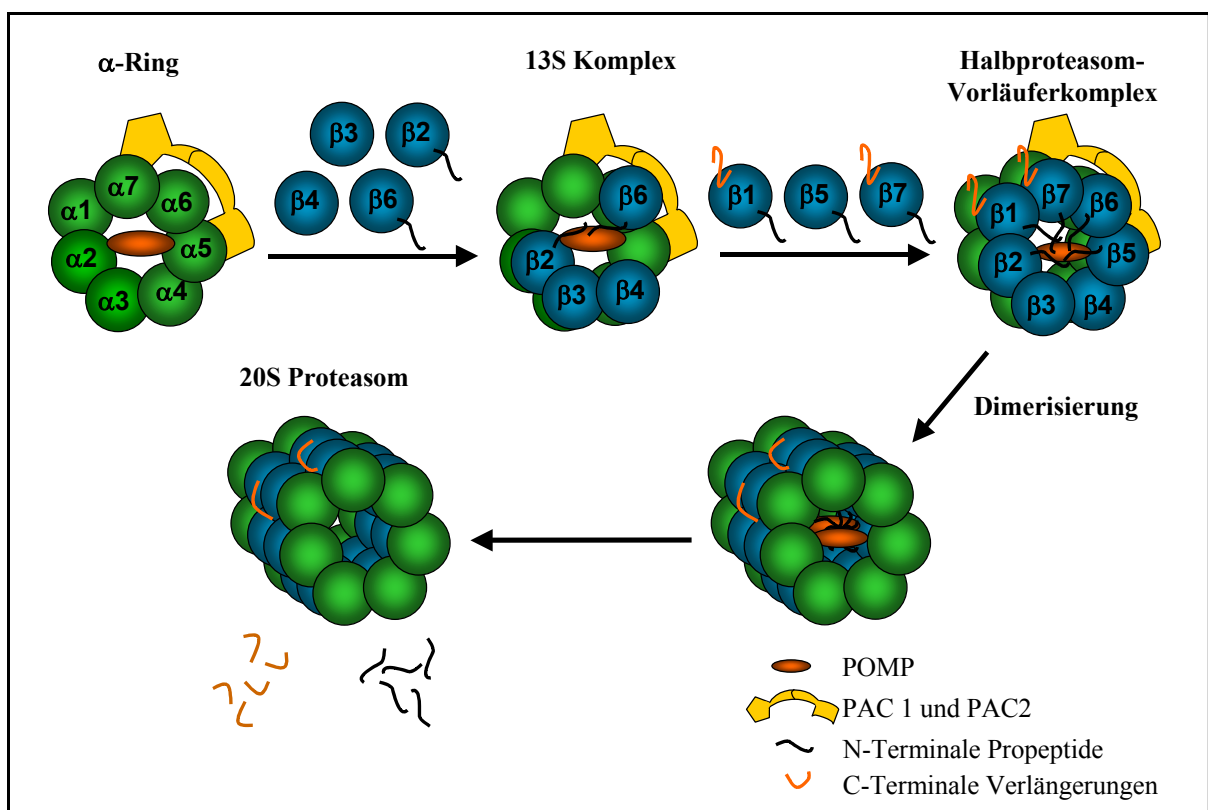


Abb. 30 Modell der Assemblierung von 20S Proteasomen in Mammalia-Zellen.

Als eine limitierende Untereinheit des Assemblierungsprozess in humanen Zelllinien (WI38T und HL60) wurde $\beta 5$ von Chondrogianni *et al.* beschrieben (Chondrogianni *et al.*, 2005). Leider konnte aufgrund der Verteilung von $\beta 5$ auf mehrere Spots in den ausgeführten 2D-Gel Analysen keine Aussage über den zeitlichen Einbau dieser Untereinheit gemacht werden (s. Abb 15 und 16). $\beta 5$ gehört jedoch zu den spät integrierten Untereinheiten und spielt eine limitierende Rolle während des Assemblierungsprozesses.

Während Immunpräzipitationen der Komplexe nach 60 Minuten radioaktiver Markierung der HeLa Zellen hauptsächlich frisch synthetisierte und spät in Komplexe inkorporierte Untereinheiten enthalten, aber kaum Untereinheiten des 13S Vorläuferkomplexes, sind nach 120 Minuten fast alle Untereinheiten des 20S Proteasoms zu detektieren und auch wesentlich größere Mengen maturierter Untereinheiten gegenüber ihren Proformen. Bisherige Publikationen geben eine Halbwertszeit von 13S-16S Vorläuferkomplexen von weniger als 2 bis 6 Stunden in murinen Zelllinien (Frentzel *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1995) und von ca. 2 Stunden in humanen Lymphoblastomzellen (Patel *et al.*, 1994) an, wobei auch hier keine Unterscheidung zwischen rein konstitutiven und mit Immununtereinheiten besetzten Assemblierungsintermediaten getroffen wird. Für die Halbwertszeit ist eine Unterscheidung von konstitutiven zu Immununtereinheiten enthaltenden Proteasomen besonders wichtig, da Immunoproteasomen im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen etwa viermal schneller assemblieren (Heink *et al.*, 2005). Die Halbwertszeit von POMP in nicht IFN γ induzierten HeLa Zellen, wie sie auch für die Immunpräzipitationen verwendet wurden, wurde auf 82 Minuten bestimmt (Heink *et al.*, 2005). Dieser Wert stimmt mit den aus den 2D-Gel Analysen gewonnenen Ergebnissen überein (s. Abb. 15 und 16). Zwischen den Zeitpunkten von 60 und 120 Minuten erfolgt eine Verschiebung von nur wenigen in Assemblierungsintermediate eingebauten detektierbaren Untereinheiten zu einer vollständigen Markierung aller Untereinheiten des 20S Proteasoms. Auch die kurze Halbwertszeit der Proform von $\beta 7$ spiegelt sich in den Analysen wider. In den Immunpräzipitationen mit dem gegen $\alpha 6$ gerichteten Antikörper ist die Proform von $\beta 7$ überhaupt nicht detektierbar, obwohl dieser Antikörper auch Vorläuferkomplexe erkennt. Ebenso ist keine Propeptid tragende $\beta 1$ Untereinheit detektierbar. In den durch die Immunpräzipitation mit dem gegen die $\beta 7$ Untereinheit gerichteten Antikörper gewonnenen Komplexen ist weder die Proform von $\beta 1$ und nach 120 Minuten „pulse“-Zeit auch kaum noch die Proform der $\beta 7$ verglichen mit der Menge maturierter Untereinheit zu finden. Diese Daten bestätigen zum einen die bestimmte Halbwertszeit für POMP enthaltende proteasomale Vorläuferkomplexe als auch die Kurzlebigkeit der dem 13S Vorläuferkomplex nachfolgenden Assemblierungsintermediate.

17 Die Rolle akzessorischer Faktoren für den Assemblierungsvorgang

Hirano *et al.* haben vor kurzem *in vitro* und angeblich auch *in vivo* einen α -Ring nachgewiesen, der mit den akzessorischen Faktoren PAC1 und PAC2 in stöchiometrischen Mengen assoziiert vorliegt (Hirano *et al.*, 2005). Diese Proteine sollen bei der Formierung eines α -Ringes als Gerüst für die Anlagerung der α -Untereinheiten $\alpha 5$ und $\alpha 7$ dienen und die Komplexierung mehrere α -Ringe verhindern. Da für die humane $\alpha 7$ Untereinheit eine Homooligomerisierung beschrieben ist (Gerards *et al.*, 1997), wäre eine Bindung an akzessorische Proteine oder Chaperone kurz nach der Synthese unbedingt notwendig, um unstrukturierte Komplexbildungen zu verhindern. Die Assoziation von PAC1 und PAC2 konnte jedoch während der *in vitro* stattfindenden Formierung von α -Ring im Verlauf dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Durch Immunpräzipitationen von α -Ringstrukturen aus Dichtegradientenfractionen konnten alle sieben α -Untereinheiten und auch POMP, jedoch PAC1 und PAC2 nicht detektiert werden. Auch unter den von Hirano *et al.* (2005) beschriebenen Bedingungen konnten die beiden Proteine in den 2D-Gel Analysen nicht detektiert werden. Es konnte ebenso kein Einfluss auf die Formierung von α -Ring durch PAC1 und PAC2 *in vitro* beobachtet werden. Es kam zu Komplexbildungen auch ohne eine Coexpression von PAC1 und PAC2 (nicht gezeigte Daten). Eine Formierung von α -Ring fand auch unter den von Hirano *et al.* (2005) angewendeten Bedingungen ohne eine Coexpression von PAC1 und PAC2 statt. Diese war jedoch verlangsamt und weniger effizient.

Ob es einen α -Ring als Assemblierungsintermediat, wie von Hirano *et al.* beschrieben und *in vitro* im Rahmen dieser Arbeit generiert, auch in HeLa Zellen gibt, ist fraglich. Unterschiedliche Versuche, aus Dichtegradientenfractionen von radioaktiv markierten Gesamtzelllysaten einen α -Ring immunupräzipitieren, sind nicht gelungen (nicht gezeigte Daten).

Weitere akzessorische Proteine des Assemblierungsvorgangs in Mammalia Zellen sind Hsc73, das mit dem 16S Vorläuferkomplex assoziiert vorliegt (Schmidtke *et al.*, 1997), Hsp90 und Proteine der 14-3-3 Familie (Heink, 2005), die mit aus nur wenigen proteasomalen Untereinheiten bestehenden Vorläuferkomplexen interagieren (Heink, 2005). In den Abbildungen 15 und 16 konnte das Auftreten zweier Spots nach kurzer radioaktiver

Markierung der Zellen beobachtet werden. Bei diesen Proteinen könnte es sich um Hsp70 und Hsp90 handeln, da die Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte der beiden Proteine mit den gefundenen Spots im 2D-Gel übereinstimmen.

18 Lokalisation von 20S Proteasomen und ihren Assemblierungsintermediaten

Lokalisationsstudien an konstitutiven und Immunoproteasomen sind bisher mittels biochemischer, immunocytochemischer und immunhistochemischer Methoden durchgeführt worden (Knecht und Rivett, 2000; Rivett, 1998; Wojcik und DeMartino, 2003).

Bei diesen Untersuchungen ist zu berücksichtigen, dass die Lokalisation innerhalb einer Zelle von Wachstumsbedingungen, Entwicklungsstadium und physiologischem Zustand der Zellen abhängt (Knecht und Rivett, 2000). Auch verschiedene Fixiermethoden für indirekte Immunfluoreszenzen führen zur veränderten Exposition von Epitopen, so dass Lokalisationsstudien mit einem Antikörper in verschiedenen Proben zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können (Machiels *et al.*, 1995; Mengual *et al.*, 1996; Nannmark *et al.*, 1996). Des weiteren ist darauf zu achten, dass abweichend ausgeprägte Immunfluoreszenzsignale nicht immer tatsächliche Proteasomenverhältnisse in den subzellulären Kompartimenten der Zelle widerspiegeln (Machiels *et al.*, 1995; Machiels *et al.*, 1996; Nannmark *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1994). Das erschwert die Interpretation von Lokalisationsstudien und den Vergleich mit früheren Publikationen.

18.1 20S Proteasomen und Vorläuferkomplexe im Cytoplasma

Der größte Teil der zellulären Proteasomenpopulation in Mammalia-Zellen ist cytoplasmatisch (Rivett *et al.*, 1992). Konstitutive Proteasomen zeigen in immunocytochemischen Experimenten eine gleichmäßige Verteilung mit Aussparung des ER-Lumen (Bandoh *et al.*, 2005; Brooks *et al.*, 2000a). Eine β 1i-GFP stabil transfizierte Zelllinie zeigt eine sehr ähnliche cytoplasmatische Verteilung. Durch „FRAP“ Experimente konnte dabei gezeigt werden, dass sich die markierten Proteasomen frei in der Zelle bewegen und nicht an Strukturen gebunden vorliegen (Reits *et al.*, 1997). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei der Untersuchung einer Immununtereinheit nicht um rein konstitutive

Proteasomen handelt und gemischte Komplexe entstehen, die von Reits *et al.* nachgewiesen wurden. Andere Gruppen beschreiben auch eine partielle Assoziation mit Cytoskelett-Strukturen (Arcangeletti *et al.*, 1997; De Conto *et al.*, 1997; Olink-Coux *et al.*, 1994).

In den in dieser Arbeit angefertigten Immunfluoreszenzstudien von konstitutiven 20S Proteasomen liegt eine gleichmäßige cytoplasmatische Verteilung vor. Mit den angewandten Methoden kann jedoch keine Aussage über Assoziationen mit Cytoskelett-Strukturen oder Zellorganellen getroffen werden. Immunoproteasomen und Assemblierungsintermediate konnten zu einem geringeren Teil auch im Cytoplasma lokalisiert werden. Des weiteren konnten durch mechanischen Zellaufschluss während der Fraktionierungsexperimente die postulierte ER-Lokalisation der proteasomalen Vorläuferkomplexe biochemisch bestätigt werden.

Eine cytoplasmatische Lokalisation für proteasomale Vorläuferkomplexe wurde von Yang *et al.* (1995) beschrieben. Dabei handelt es sich wieder um einen β 1i enthaltenden Komplex, so dass keine rein konstitutiven Proteasomen vorliegen, wie sie in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden. In dieser Arbeit ist darüber hinaus gezeigt worden, dass die Assoziation von Vorläuferkomplexen mit dem ER sehr labil gegenüber mechanischem Stress ist und stark von den gewählten Pufferbedingungen abhängt. Daher kann der Großteil der Assemblierungsintermediate unter anderen Bedingungen im Cytoplasma detektiert werden. Immuncytochemische Studien, die den Vorteil gegenüber biochemischen Methoden haben, dass sie einen Momentstatus der Zelle abbilden und durch die Fixierung weniger abhängig von den verwendeten Puffern ist, sind von Yang *et al.* nicht durchgeführt worden.

18.2 20S Proteasomen und Vorläuferkomplexe im Zellkern

Die Konzentration von 20S Proteasomen in Zellkernen erscheint in Aufnahmen indirekter Immunfluoreszenzen häufig sehr viel höher als im Cytoplasma. Biochemisch konnte jedoch gezeigt werden, dass die Konzentration zum Beispiel in Rattenhepatocyten und RMA Zellen im Zellkernen ca. 10 mal niedriger ist (Palmer *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1995). Rivett *et al.* (1992) quantifizierten die Menge der nukleären 20S Proteasomen in Rattenhepatocyten auf 17% der Gesamtproteasomenmenge. Da die Verteilung der Proteasomen in Zellen stark variiert, kann diese Aussage nicht auf alle Zellen übertragen werden. In dieser Arbeit konnte aber auch in HeLa Zellen eine sehr viel stärkere Immunfluoreszenz in den Zellkernen

gegenüber dem Cytoplasma beobachtet werden, obwohl der Anteil der Proteasomen im Kern gegenüber der Gesamtproteinmenge äußerst gering ist. Immunproteasomen hingegen, die hauptsächlich mit dem ER assoziiert vorliegen, zeigen nur eine schwache Kernlokalisation.

Vier der sieben α -Untereinheiten tragen klassische NLS, die einen Kerntransport von Proteasomen über den Importin-Transportweg in den Zellkern erlauben (Knecht und Rivett, 2000; Knuehl *et al.*, 1996; Unno *et al.*, 2002). In *S. cerevisiae* werden proteasomale Vorläuferkomplexe über die klassischen Importin-Transportweg in den Zellkern transportiert, wo es zu letzten Assemblierungs- und Maturierungsschritten kommt (Lehmann *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings kein Vorläuferkomplex oder darauf hinweisende Marker im Zellkern humaner Zellen detektiert werden. Die Assemblierung in humanen Zellen unterscheidet sich von der in *S. cerevisiae* demnach nicht nur in der Reihenfolge der integrierten Untereinheiten, sondern auch in der Lokalisation.

18.3 Assoziation proteasomaler Komplexe mit dem Endoplasmatischen Retikulum

Rivett *et al.* (1992) konnten 4-14% der zellulären Proteasomenpopulation in verschiedenen Zellen mittels Immunogold-Markierung am Endoplasmatischen Retikulum detektieren. In Rattenhepatocyten betrug die Menge ER assoziierter Proteasomen ca. 8%. Damit ist die Konzentration ER-assoziiierter Proteasomen in diesen Zellen ca. 6-7 mal niedriger als im Cytoplasma (Palmer *et al.*, 1996).

In derselben Publikation wurde die Verteilung von zwei α -Untereinheiten mit je einer Untereinheit des konstitutiven und des Immunproteasoms verglichen. Die subzelluläre Lokalisation der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 7$ in IFN γ induzierten Zellen glich der konstitutiver 20S Proteasomen, jedoch unterschied sich die Lokalisation der Untereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 2$. Die Immununtereinheit wurde in stärkerem Maße am ER detektiert, während sich an der Verteilung der konstitutiven Untereinheit $\beta 2$ nichts änderte, die hauptsächlich im Cytoplasma zu finden war (Palmer *et al.*, 1996). Wiederholt konnten Untereinheiten des Immunproteasoms verstärkt am ER detektiert werden (Bandoh *et al.*, 2005) und dort auch mit ER Markern colokalisiert werden (Brooks *et al.*, 2000b). Eine Assemblierung von Immunproteasomen konnte lediglich in transfizierten Zellen indirekt über den Inhibitor PI31, der den Assemblierungsprozess dieses Proteasomensubtyps hemmt, am ER lokalisiert werden (Zaiss *et al.*, 2002).

Die vorrangige ER Assoziation der Immunountereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 5i$ konnte im Rahmen dieser Arbeit in HeLa Zellen bestätigt werden. Palmer *et al.* (1996) zeigten allerdings, dass die Assoziation von Proteasomen mit dem ER relativ schwach ist. Durch Waschen mit einer 0,25 M Saccharoselösung diffundierten die Komplexe von präparierten Mikrosomen in den Überstand. Das entspricht dem Verhalten von Assemblierungsintermediaten konstitutiver Proteasomen bei Präparationen von Mikrosomen aus HeLa Zellen. Die Vorläuferkomplexe dissoziieren bereits durch Inkubation der Mikrosomen mit magnesiumfreiem Puffer (s. Abb. 22). Das Verhalten könnte auch an der essentiellen Rolle von Magnesium bei der Komplexstabilität liegen. Proteasomen enthalten 18 Magnesium-Ionen, die den Komplex stabilisieren. Davon verstärken einige die Interaktion der beiden im maturierten Proteasom gegenüberliegenden β -Ringe (Groll *et al.*, 1997). Falls ein Halbproteasom-Vorläuferkomplex mit den β -Ring und POMP zur Membran gerichtet an das ER gebunden vorliegt, könnte ein Entzug des Magnesiums zu Konformationsänderungen führen, die nicht die Gesamtstruktur des Komplexes beeinflussen müssen, aber eine Dissoziation von der ER Membran bewirken können.

Es werden verschiedene Bindungspartner für Proteasomen diskutiert, die eine Assoziation an das ER vermitteln sollen. Es wurde gezeigt, dass der 19S Regulator das 20S Proteasom an den Sec61 Kanal dirigiert und diese Bindung mit der von Ribosomen konkurriert (Kalies *et al.*, 2005). Der Sec61 Komplex dient möglicherweise als Translokationskanal während des retrograden Transports von fehlgefalteten ER Proteinen über das ERAD System (Meusser *et al.*, 2005). Partiiell wurden bei diesen Bindungsstudien Proteasomen aus *S. cerevisiae* und HPM eingesetzt, wodurch es sich um Proteinkomplexe aus unterschiedlichen Spezies handelt. Liao *et al.* (2003) zeigten den Abbau von Apolipoprotein B am Endoplasmatischen Retikulum durch das 26S Proteasom. Dabei lokalisierten 26S Proteasomen und Sec61 am rauen und glatten ER, nicht aber am Golgi-Apparat der Zellen. Von Rivett *et al.* konnten bereits 1992 Proteasomen am rauen ER detektiert werden, allerdings steht das im Widerspruch zu späteren Daten der gleichen Arbeitsgruppe, die Proteasomen nur mit dem glatten ER und dem *cis*-Golgi assoziiert vorfanden (Brooks *et al.*, 2000a).

Auch Ecm29 wird als Adapterprotein diskutiert. Es wird diskutiert, dass 26S Proteasomen von Ecm29 an Endosomen, aber auch an das ER rekrutiert werden können. (Gorbea *et al.*, 2004).

Die meisten Arbeiten zur Lokalisation von 20S Proteasomen wurden mit Antikörpern durchgeführt, die nicht zwischen Assemblierungsintermediaten und reifen 20S Proteasomen

unterscheiden können, da die Antikörper Untereinheiten erkennen, die bereits in Vorläuferkomplexe integriert sind.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal eine Lokalisation proteasomaler Assemblierungsintermediate mit spezifischen Antikörpern am ER gezeigt. Damit ergibt sich ein zumindest partiell kompartmentassoziierter und örtlich begrenzter Assemblierungsprozess. Da nur ein Ausschnitt des Assemblierungsprozesses mit den hier verwendeten Antikörpern untersucht wurde, können lediglich Aussagen über Komplexe getroffen werden, die Proformen katalytischer β -Untereinheiten und das Assemblierungsprotein POMP beinhalten. Über früh komplexierende Untereinheiten und aus nur wenigen Untereinheiten aufgebaute Intermediate konnten keine Ergebnisse mit den hier angewandten Mitteln gewonnen werden.

Vor der Umbenennung durch Hirano *et al.* (2005) war der akzessorische PAC1 unter der Bezeichnung DSCR2 „down syndrome critical region 2“ bekannt. Für dieses Protein wurde ebenfalls eine ER Assoziation beschrieben (Possik *et al.*, 2004). Somit könnte PAC1 eine Plattform am ER bilden und frühe α -Untereinheiten rekrutieren. Durch eine Interaktion mit α -Untereinheiten, wie sie in „*Yeast-Two-Hybrid*“ Experimenten gezeigt wurde, könnte POMP in den sich formierenden α -Ring integriert werden (Heink, 2005). Vermittelt durch POMP könnten sowohl früh als auch spät integrierte β -Untereinheiten in den Komplex dirigiert werden und zur Formierung von Halbproteasom-Vorläuferkomplexen führen (s. Abb. 32). Da nachfolgende Schritte mit einer sehr hohen Geschwindigkeit vollzogen werden, konnten diese Prozesse und eine mögliche Assoziation dieser Schritte mit dem ER nicht überprüft werden. Jedoch liegt der Großteil der Proformen katalytischer β -Untereinheiten ER gebunden vor, so dass eine ER Assoziation bis zur Vervollständigung des 20S Proteasoms und damit der Maturierung der β -Untereinheiten gut möglich wäre (s. Abb. 20-22).

Chondrogianni *et al.* (2005) transfizierten humane Zellen mit der spät in Vorläuferkomplexe eingebauten Untereinheit $\beta 5$ und erhielten in den Transfektanten signifikant größere Mengen an maturierten 20S Proteasomen. Darüber hinaus veränderte sich die Lokalisation von proteasomalen Komplexen in den transfizierten Zellen. Es gibt in durchgeführten Immunfluoreszenzstudien ein deutliche stärkeres Signal von proteasomalen Untereinheiten am Endoplasmatischen Retikulum (Abb. 31), was nach der in dieser Arbeit gezeigten Lokalisation von proteasomalen Vorläuferkomplexen mit einem verstärkten Assemblierungsvorgang korrelieren könnte. Eine

vermehrte Assemblierung ist auch Voraussetzung für signifikant erhöhte Proteasomenaktivität. In den verwendeten Zellen könnte also die β_5 Untereinheit entweder eine limitierende Untereinheit im Prozess der proteasomalen Assemblierung sein oder durch die Überexpression eine Induktion oder Aktivierung der anderen spät eingebauten β -Untereinheiten stattfinden. In jedem Fall scheint ein verstärkter Assemblierungsprozess stattzufinden.

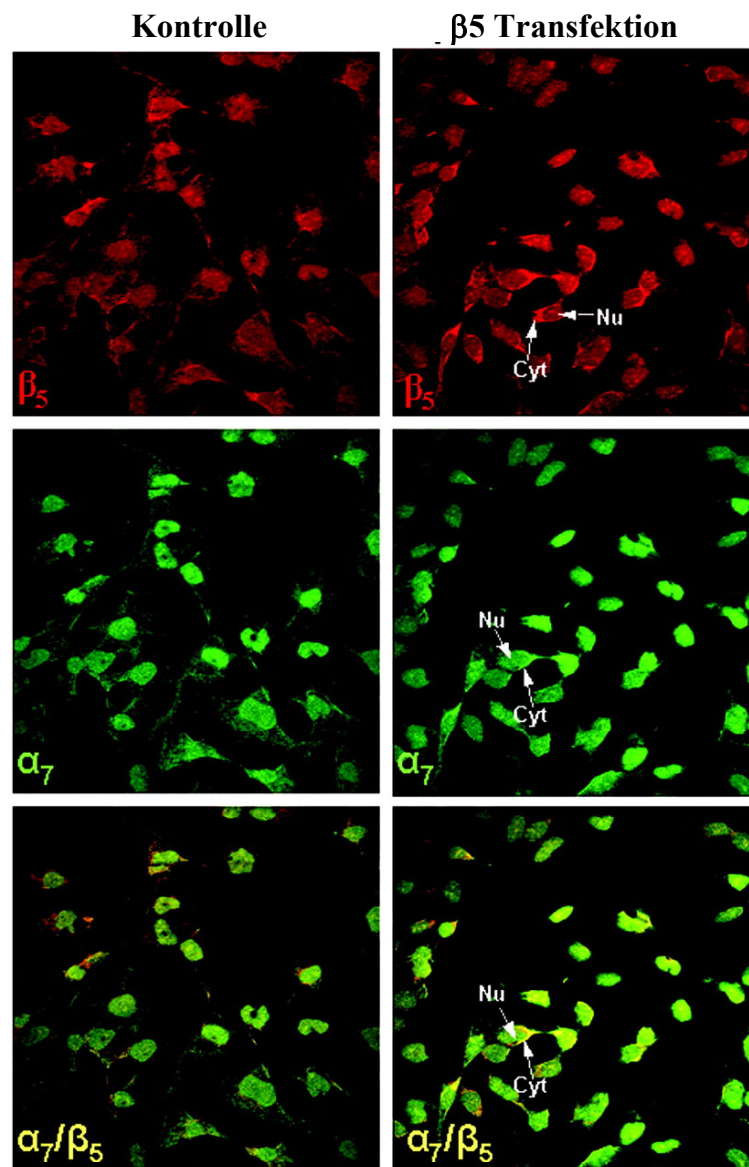


Abb. 31 Immunfluoreszenzaufnahmen von wt und β_5 überexprimierenden WI38/T Zellen (Chondrogianni et al., 2005). Die Zellen wurden mit α_7 und β_5 angefärbt und es können deutlich stärkere Signale nach einer Transfektion mit β_5 am ER beobachtet werden.

Ein weiterer Faktor, der bei der Assoziation des proteasomalen Vorläuferkomplexes an ER Membranen beteiligt sein könnte, ist das in dieser Arbeit massenspektrometrisch identifizierte Protein LRP130. Für LRP130 wurde eine ähnliche ER Lokalisation wie für proteasomale Vorläuferkomplexe beschrieben. Da LRP130 gleichzeitig ein mRNA bindendes Protein ist (Tsuchiya *et al.*, 2004), könnte dieses Protein für einen Transport proteasomaler mRNA an das ER verantwortlich sein.

Nicht nur Proteine, sondern auch Phospholipide könnten an einer Interaktion mit der ER Membran beteiligt sein. Für 20S Proteasomen wurden bereits solche Interaktionen nachgewiesen. Das 20S Proteasom assoziiert zum Beispiel mit Phosphatidylinositol-Monolayern. Dabei steht das Proteasom senkrecht auf einem α -Ring und ist damit nur noch von einer Seite aus zugänglich (Newman *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch POMP Interaktionen mit Liposomen eingeht (s. Abb. 25).

19 Lokalisierte Assemblierungsvorgänge

Dass Assemblierungsvorgänge häufig an Matrices gebunden stattfinden, um eine räumliche Begrenzung des Prozesses und damit einen vereinfachten Zusammenbau zu bewirken, konnte bereits für andere Komplexe und virale Polyproteine beobachtet werden. Zum Beispiel findet eine Initiation der Translation durch einen Assemblierungsprozess von Ribosomen und Initiationsfaktoren an der Initiator-Methionyl-Transfer-RNA statt. Dabei rekrutieren Initiationsfaktoren die 40S Untereinheit des Ribosoms, es kommt zu Erkennung des Startkodons und zur Assoziation mit der 60S Ribosomenuntereinheit, um die Translation zu starten (Preiss und Hentze, 2003). In diesem Fall ist der Assemblierungsprozess an den späteren Wirkungsort, die mRNA, gekoppelt. In HeLa Zellen scheint der Großteil der proteasomalen Vorläuferkomplexe an das ER gebunden zu sein, während 20S Proteasomen nur zu einem geringen Teil am ER lokalisiert sind. Demnach scheint der Assemblierungsvorgang nicht aufgrund des späteren Wirkungsortes dort lokalisiert zu sein.

Ein Beispiel für einen ER lokalisierten Assemblierungsprozess ist der aus nichtstrukturellen Proteinen bestehende RNA-Duplikationskomplex des Hepatitis C Virus. Dieser Komplex besteht aus viralen und zelleigenen Proteinen und liegt mit dem ER assoziiert vor, um dort die Virus-RNA zu replizieren (El-Hage und Luo, 2003). Bisher sind nur Proteine oder Komplexe

beschrieben, die eine ER Bindung von maturierten 20S beziehungsweise 26S Proteasomen herbeiführen könnten (s. Kap 18.3). Proteasomale Vorläuferkomplexe interagieren mit POMP, PAC1 und LRP130, die eine ER Assoziation vermitteln könnten.

Die Assoziation der Vorläuferkomplexe könnte auch durch eine Interaktion mit einem integralen Protein ermöglicht werden, wie für die ERAD Komponente Ubc7p in *S. cerevisiae* beschrieben (Biederer *et al.*, 1997). Ubc7p wird durch das integrale ER-Protein Cue1p an das ER rekrutiert und ist im Komplex an der Ubiquitinierung von ERAD-Substraten wie CPY* beteiligt. In diesem Fall handelt es sich um einen Assemblierungsprozess, der lösliche und ansonsten im Cytosol verbleibende Proteine am ER durch integrale Proteine verankert und so den Abbau von Substraten erst ermöglicht. Ein ähnlicher Prozess könnte für die Lokalisation der Assemblierung von Proteasomen gelten. POMP oder andere Assemblierungsfaktoren könnten durch integrale Membranproteine an die ER-Membran gebunden werden und ihrerseits wiederum proteasomale Untereinheiten rekrutieren und so einen lokal begrenzten Assemblierungsprozess auslösen.

Da POMP auch *in vitro* mit Liposomen assoziiert vorliegt und Proteasomen mit Phosphatidylinositol wechselwirken, könnte auch eine Interaktion mit Phospholipiden die Assemblierungskomplexe mit dem ER verbinden. Für eine Interaktion von Proteinen mit Phospholipiden gibt es Beispiele, in denen Prozesse der Lipidsynthese durch spezifische Bindungen von Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Ein Beispiel dafür wäre das Opi1p/Scs2p System in Hefen. Der Transkriptionsfaktor Opi1p bindet im Komplex mit Scs2p an Phosphatidsäure, die einen wichtigen Regulator des Lipidstoffwechsels in Hefen darstellt. Durch Umwandlung von Phosphatidsäure in Phosphatidylinositol wird der Komplex vom ER entlassen und der Transkriptionsfaktor kann mittels seiner NLS in den Zellkern transportiert werden (Daum, 2004).

Einen komplexen Assemblierungsvorgang lokal begrenzt stattfinden zu lassen, kann somit aus mehreren Gründen sinnvoll sein. Ein Komplex kann an seinen Wirkungsort dirigiert werden, um nicht als Komplex aktiv transportiert werden zu müssen und damit die Zeit vom Signal bis zum Einsatz unnötig zu verlängern. Ein Komplex kann auch an ein Kompartiment gebunden sein, um ihn damit von seiner Funktion abzuhalten. Eine Lokalisation kann durch lokalisierte Chaperone oder andere akzessorische Faktoren bestimmt werden. Im Falle des Proteasoms könnte das ER nicht nur als Matrix dienen, um eine gerichtete Assemblierung zu ermöglichen,

sondern auch ein Bindungsort für einen mRNA rekrutierenden Faktor wie LRP130 sein. Auf diese Weise könnte die Translation der Untereinheiten durch Bindung der mRNAs an LRP130 gebündelt und eine Assemblierung aufgrund der räumlichen Nähe frisch synthetisierter Untereinheiten erleichtert werden. Dafür müsste die Lokalisation proteasomaler mRNAs in humanen Zellen untersucht werden.

Ein Modell des ER assoziierten Biogeneseprozesses ist in Abbildung 32 schematisch dargestellt.

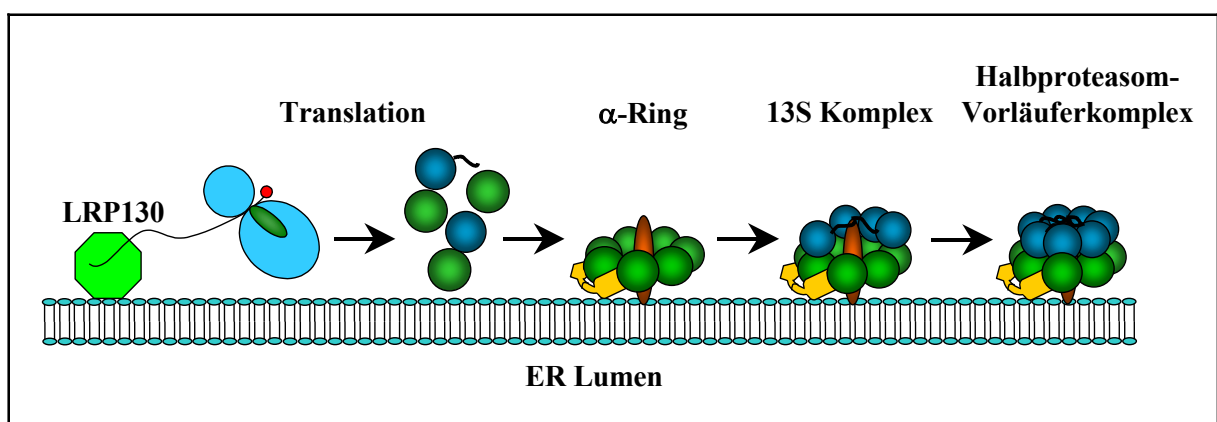


Abb. 32 Modell des ER assoziierten Biogenesevorgangs von 20S Proteasomen. LRP130 könnte die mRNAs der proteasomalen Untereinheiten und der Assemblierungsfaktoren an das ER rekrutieren, wodurch bereits der Translationsprozess ER gebunden vollzogen würde. Im weiteren Verlauf könnte eine ER Assoziation der Untereinheiten über die Assemblierungsproteine POMP und PAC1 vermittelt werden.

20 Interaktion von POMP mit Membranen

Dem Assemblierungsfaktor POMP als essentiellern Bestandteil des Assemblierungskomplexes ist im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Lokalisation in humanen Zellen zugeordnet worden. Seine Interaktion mit dem Endoplasmatischen Retikulum ist scheinbar konformationsabhängig, da einzelne Domänen des Proteins keine Interaktion mit HPMs eingehen. Daher kann eine sequenzspezifische membranverankernde Modifikation und auch eine Interaktion über kurze Aminosäuresequenzen ausgeschlossen werden. Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung von POMP wird eine globuläre und sehr variable Struktur vorhergesagt. Kristallisationen von POMP-haltigen proteasomalen Assemblierungsintermediaten als auch von POMP allein sind bisher fehlgeschlagen (Elke

Krüger; Michael Groll, persönliche Kommunikation). Nach den Immunfluoreszenzbildern gibt es in HeLa Zellen auch eine geringere Menge POMP, die nicht in Assemblierungsintermediaten integriert in den Zellen vorliegt, aber ihrer Lokalisation nach auch ER assoziiert sein könnte. Der größte Teil des in der Zelle vorkommenden POMP ist somit am ER-Netzwerk lokalisiert. POMP konnte bei Zellfraktionierungen und Mikrosomenpräparationen auch zu Anteilen in der cytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden, sofern der Zellaufschluss mit einem Potter durchgeführt wurde. Nach einem Zellaufschluss durch „freeze/thaw“-Zyklen konnte POMP allerdings nahezu vollständig durch Zentrifugation pelletiert werden. Das bestätigt die Ergebnisse der Immunfluoreszenzaufnahmen, die POMP mit dem ER assoziiert zeigen. Ein weiteres Indiz für eine ER Lokalisation ergaben Immunfluoreszenzexperimente mit POMP-GFP Konstrukten, die in HeLa Zellen exprimiert wurden. Auch in diesem Fall wurde das funktionell in den Komplex integrierte POMP-GFP am ER nachgewiesen (Elke Krüger, persönliche Kommunikation).

Aufgrund der quantitativen Assoziation scheint die Interaktion abhängig von bestimmten Membranbestandteilen zu sein. In Frage kommen sowohl Phospholipide als auch andere ER assoziierte oder integrale Proteine. Jedoch könnte aufgrund der *in vitro* Experimente von einer Phospholipidassoziation von POMP ausgegangen werden. POMP interagiert zum einen mit proteinfreien Liposomen und zum anderen sind die verwendeten Hundepankreasmikrosomen vorher stringent behandelt worden, um Ribosomen und mRNA von den Mikrosomen abzuwaschen, so dass assoziierte Proteine dissoziiert sein sollten. Dass die Assoziation des Komplexes mit dem ER so sensibel gegenüber Scherkräften ist, könnte auf eine Exposition des Komplexes an den Mikrosomen hindeuten. Die Störung der Bindung an das ER durch die Verwendung von Mg^{2+} freien Puffern kann vielfältige Ursachen haben. Das Fehlen von Magnesium könnte die Membranstrukturen stören, wodurch eine Oberflächenassoziation von POMP mit den Lipiden nicht mehr möglich wäre. Ebenso könnte es sich um eine magnesiumabhängige Bindung an Ankerproteine oder verankernde Polynucleotide handeln. Bei der Isolation von 20S Proteasomen über verschiedene Methoden werden immer substöchiometrisch 80-100 Nukleotide große RNA Fragmente mit angereichert (Skilton *et al.*, 1991). Pamnani *et al.* (1994) fanden keine Stöchiometrie in der Menge an 20S Proteasomen und der RNA und konnten Assoziationen ähnlicher RNA-Fragmente auch mit anderen Komplexen (z. B. GroEL) nachweisen, woraus sie schlossen, dass es sich um Artefakte handelt. Möglicherweise ist aber die RNA auch nur Bestandteil von proteasomalen Vorläuferkomplexen beziehungsweise gerade maturierten Komplexen und stellt so die Verknüpfung zum ER her

(Pamnani *et al.*, 1994). Um darüber eine Aussage treffen zu können, müssten Vorläuferkomplexaufreinigungen auf die Gegenwart von RNA Molekülen untersucht werden.

21 Die essentielle Rolle von POMP während des Assemblierungsprozesses

Der Assemblierungsfaktor POMP liegt in HeLa Zellen zum größten Teil ER assoziiert vor und ist dort in Vorläuferkomplexe eingebaut. Durch eine Depletion von POMP mittels siRNA kommt es zu keiner weiteren Formierung von für die Proteasomenbiogenese verwendbaren Assemblierungsintermediaten, so dass die proteasomale Homöostase in den transfizierten Zellen gestört ist. In HeLa Zellen beträgt die proteasomale Aktivität nach 48 Stunden POMP-siRNA Behandlung nur noch ca. 40% des Ursprungswertes und die Zellen leiten die Apoptose ein (Heink *et al.*, 2005).

Ebenso wurde in der Arbeit von Heink *et al.* die Interaktion von POMP mit den humanen Untereinheiten $\beta 5$ und $\beta 5i$ nachgewiesen, die durch POMP in die Vorläuferkomplexe rekrutiert werden. In „*Yeast-Two-Hybrid*“ Experimenten wurde nicht nur eine deutliche Interaktion mit der $\beta 5$ Untereinheit, sondern zusätzlich mit den humanen Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 7$ gezeigt, die von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen unabhängig bestätigt wurde (Heink *et al.*, 2005; Jayarapu und Griffin, 2004). Es konnte zumindest für die Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 5$ gezeigt werden, dass die Proformen nicht mehr an das ER rekrutiert werden können, sobald POMP durch siRNA in den Zellen depletiert wurde. Aufgrund von Detektions- und Isolierungsschwierigkeiten von Assemblierungsintermediaten, die weniger proteasomale Untereinheiten als der 13S Vorläuferkomplex beinhalten, kann keine Aussage über mögliche Vorläuferkomplexe aus α -Untereinheiten ohne POMP am ER getroffen werden. Da POMP jedoch auch mit α -Untereinheiten im „*Yeast-Two-Hybrid*“ interagiert (Heink, 2005) und *in vitro* mit α -Untereinheiten assoziiert vorliegt (s. Abb. 12) (Hirano *et al.*, 2005), wird wahrscheinlich auch die Formierung der aus wenigen Untereinheiten bestehender Assemblierungskomplexe durch eine Depletion von POMP beeinflusst. Hirano *et al.* (2005) führten siRNA Experimente mit PAC1, PAC2 und POMP durch. Während der Depletion von POMP konnten größere Mengen freier α -Untereinheiten als nach PAC1 oder PAC2 Depletion detektiert werden, was für eine Beteiligung von POMP bei frühen Assemblierungsereignissen spricht.

Dem für den Assemblierungsprozess von humanen 20S Proteasomen essentiellen Faktor POMP fällt auch eine wichtige Rolle für die Rekrutierung proteasomaler Vorläuferkomplexe an das Endoplasmatischen Retikulum zu (Abb. 33). Vor allem für die Inkorporation der letzten Untereinheiten zur Formierung eines Halbproteasom-Vorläuferkomplexes am ER, was wahrscheinlich einen der wichtigsten Regulationsschritte während des Assemblierungsvorgang darstellt, ist POMP unersetzlich. Gleichzeitig werden die Vorläuferkomplexe durch die Interaktion von POMP mit Phospholipiden der ER Membran verankert, wodurch der Assemblierungsprozess örtlich begrenzt wird.

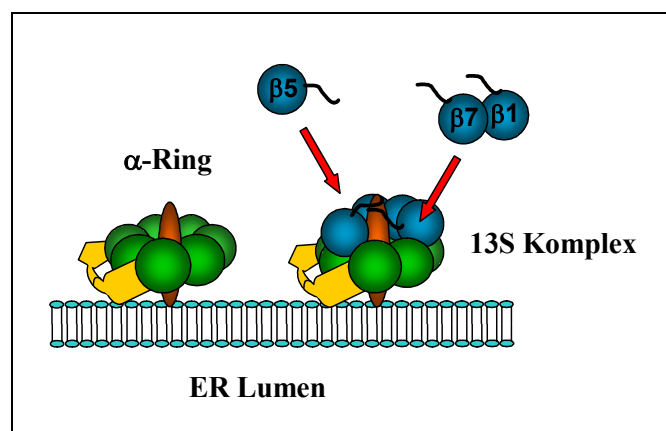


Abb. 33 Modell der durch POMP vermittelten Rekrutierung von $\beta 1$, $\beta 5$ und $\beta 7$, die zur Bildung eines Halbproteasomen-Vorläuferkomplexes führen.

22 Ausblick

Im Verlauf dieser Arbeit wurde der Ablauf der Assemblierung des humanen 20S Proteasoms weiter entschlüsselt. Offen bleibt aber vor allem die Existenz und Zusammensetzung von dem 13S Vorläuferkomplex vorangehenden Assemblierungsintermediaten. Es sollten die Existenz eines α -Ringes weiter ergründet und auch die initiierten Komplexe aus nur wenigen Untereinheiten analysiert werden. Zu der Identifizierung solcher Komplexe könnten Antikörperscreenings durchgeführt werden, die vorläuferkomplex-spezifische Konformationen proteasomaler Untereinheiten erkennen, die bereits in Di- oder Trimeren von proteasomalen Untereinheiten vorkommen. Die Ergebnisse sollten dabei auch einen Rückschluss auf $\alpha 1$ als den α -Ring oder den 13S Vorläuferkomplex schließende Untereinheit

zulassen. Es könnten sich dabei auch alternative Assemblierungswege zum 13S Vorläuferkomplex ergeben.

Des weiteren sollten Mechanismus und Zeitpunkt der ER-Rekrutierung genauer untersucht werden. Es ist noch ungeklärt, ob bereits α -Untereinheiten mit dem ER assoziiert vorliegen und ob auch diese Assoziation durch POMP vermittelt wird oder ob POMP erst in den 13S Vorläuferkomplex integriert wird und dann für die Rekrutierung der Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 5$ und $\beta 7$ mitverantwortlich ist.

Da die Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 5$ und $\beta 7$ mit großer Sicherheit die limitierenden Untereinheiten des Assemblierungsprozesses darstellen, stellt sich die Frage, ob diese drei Untereinheiten einer anderen Regulation im Vergleich zu den übrigen proteasomalen Untereinheiten unterliegen. Weil eine konzertierte Hochregulierung proteasomaler mRNAs schon beschrieben worden ist (Meiners *et al.*, 2003), könnte es sich um einen die Translation beeinflussenden Vorgang handeln. In diesem Zusammenhang könnte auch eine mögliche Lokalisation proteasomaler mRNAs durch RNA bindende Proteine, wie sie in dieser Arbeit diskutiert wird, untersucht werden.

Ein weiteres Augenmerk sollte auf die Identifizierung zusätzlicher akzessorischer Faktoren gelegt werden. Der Abbruch des Assemblierungsvorgangs *in vitro* nach der Formierung eines 13S Vorläuferkomplexes spricht für weitere den Assemblierungsvorgang begleitende oder regulierende Faktoren, deren Identifizierung sowohl die *in vivo* Situation weiter aufklären als auch die *in vitro* Generierung von 20S Proteasomen erlauben würde. Dadurch könnte ein Modellsystem etabliert werden, in dem 20S Proteasomen mit definierten Untereinheitenzusammensetzungen aus konstitutiven Untereinheiten und Immununtereinheiten generiert werden könnten. Diese Intermediärproteasomen könnten auf diese Weise biochemisch und funktionell charakterisiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass Intermediärproteasomen abweichende Schnittpräferenzen bei der Peptidgenerierung gegenüber rein konstitutiven 20S Proteasomen oder Immunoproteasomen haben.

Die vollständige Aufklärung des Assemblierungsvorgangs humaner 20S Proteasomen und die damit ermöglichte Charakterisierung spezifischer Aufgaben proteasomaler Subtypen könnten zu einem besseren Verständnis der Rolle von Intermediärproteasomen während einer cytokinvermittelten Immunantwort humaner Zellen beitragen, aber auch deren Einfluss auf Krankheitsbilder mit proteasomaler Beteiligung erklären.

Literaturverzeichnis

- Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1994). Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem (Tokyo)* **115**, 257-69.
- Arcangeletti, C., Sutterlin, R., Aebi, U., De Conto, F., Missorini, S., Chezzi, C. and Scherrer, K. (1997). Visualization of prosomes (MCP-proteasomes), intermediate filament and actin networks by "instantaneous fixation" preserving the cytoskeleton. *J Struct Biol* **119**, 35-58.
- Arendt, C. S. and Hochstrasser, M. (1999). Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *Embo J* **18**, 3575-85.
- Bandoh, N., Ogino, T., Cho, H. S., Hur, S. Y., Shen, J., Wang, X., Kato, S., Miyokawa, N., Harabuchi, Y. and Ferrone, S. (2005). Development and characterization of human constitutive proteasome and immunoproteasome subunit-specific monoclonal antibodies. *Tissue Antigens* **66**, 185-94.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-80.
- Biederer, T., Volkwein, C. and Sommer, T. (1997). Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* **278**, 1806-9.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. and Huber, R. (1999). The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**, 295-317.
- Bose, S., Stratford, F. L., Broadfoot, K. I., Mason, G. G. and Rivett, A. J. (2004). Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J* **378**, 177-84.
- Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Klotzel, P. M., Finley, D. and Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* **1**, 221-6.
- Brodsky, J. L. and McCracken, A. A. (1999). ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 507-13.
- Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R. Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M. C., Hendil, K. B., Tanaka, K., Dyson, J. and Rivett, J. (2000a). Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J* **346 Pt 1**, 155-61.
- Brooks, P., Murray, R. Z., Mason, G. G., Hendil, K. B. and Rivett, A. J. (2000b). Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem J* **352 Pt 3**, 611-5.
- Burri, L., Hockendorff, J., Boehm, U., Klamp, T., Dohmen, R. J. and Levy, F. (2000). Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10348-53.
- Cerundolo, V., Kelly, A., Elliott, T., Trowsdale, J. and Townsend, A. (1995). Genes encoded in the major histocompatibility complex affecting the generation of peptides for TAP transport. *Eur J Immunol* **25**, 554-62.
- Chen, P. and Hochstrasser, M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* **86**, 961-72.
- Chondrogianni, N., Tzavelas, C., Pemberton, A. J., Nezis, I. P., Rivett, A. J. and Gonos, E. S. (2005). Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *J Biol Chem* **280**, 11840-50.
- Coffino, P. (2001). Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimie* **83**, 319-23.

- Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Reinauer, H. and Schwenen, M.** (1986). Studies on the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle. *Biomed Biochim Acta* **45**, 1493-501.
- Dahlmann, B., Ruppert, T., Kloetzel, P. M. and Kuehn, L.** (2001). Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie* **83**, 295-9.
- Dahlmann, B., Ruppert, T., Kuehn, L., Merforth, S. and Kloetzel, P. M.** (2000). Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol* **303**, 643-53.
- Daum, G.** (2004). Membrane targeting: glued by a lipid to the ER. *Curr Biol* **14**, R711-3.
- De Conto, F., Missorini, S., Arcangeletti, C., Pinardi, F., Montarras, D., Pinset, C., Vassy, J., Geraud, G., Chezzi, C. and Scherrer, K.** (1997). Prosome cytodistribution relative to desmin and actin filaments in dividing C2.7 myoblasts and during myotube formation in vitro. *Exp Cell Res* **233**, 99-117.
- De, M., Jayarapu, K., Elenich, L., Monaco, J. J., Colbert, R. A. and Griffin, T. A.** (2003). Beta 2 subunit propeptides influence cooperative proteasome assembly. *J Biol Chem* **278**, 6153-9.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. and Rechsteiner, M.** (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* **269**, 7059-61.
- Ditzel, L., Huber, R., Mann, K., Heinemeyer, W., Wolf, D. H. and Groll, M.** (1998). Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome. *J Mol Biol* **279**, 1187-91.
- Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K. and Rechsteiner, M.** (1992). Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* **267**, 22369-77.
- El-Hage, N. and Luo, G.** (2003). Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *J Gen Virol* **84**, 2761-9.
- Enenkel, C., Lehmann, A. and Kloetzel, P. M.** (1998). Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *Embo J* **17**, 6144-54.
- Enenkel, C., Lehmann, A. and Kloetzel, P. M.** (1999). GFP-labelling of 26S proteasomes in living yeast: insight into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. *Mol Biol Rep* **26**, 131-5.
- Fehling, H. J., Swat, W., Laplace, C., Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, U. and von Boehmer, H.** (1994). MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* **265**, 1234-7.
- Fehlker, M., Wendler, P., Lehmann, A. and Enenkel, C.** (2003). Bln3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly. *EMBO Rep* **4**, 959-63.
- Ferrell, K., Wilkinson, C. R., Dubiel, W. and Gordon, C.** (2000). Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* **25**, 83-8.
- Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A. and Kloetzel, P. M.** (1994). 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *J Mol Biol* **236**, 975-81.
- Fricke, B.** (2002). Analyse zur Lokalisation der 20S Proteasomenbiogenese. *Diplomarbeit Humboldt-Universität zu Berlin*.
- Gerards, W. L., de Jong, W. W., Bloemendal, H. and Boelens, W.** (1998a). The human proteasomal subunit HsC8 induces ring formation of other alpha-type subunits. *J Mol Biol* **275**, 113-21.
- Gerards, W. L., de Jong, W. W., Boelens, W. and Bloemendal, H.** (1998b). Structure and assembly of the 20S proteasome. *Cell Mol Life Sci* **54**, 253-62.
- Gerards, W. L., Enzlin, J., Haner, M., Hendriks, I. L., Aebi, U., Bloemendal, H. and Boelens, W.** (1997). The human alpha-type proteasomal subunit HsC8 forms a double ringlike structure, but does not assemble into proteasome-like particles with the beta-type subunits HsDelta or HsBPROS26. *J Biol Chem* **272**, 10080-6.
- Glickman, M. H. and Ciechanover, A.** (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428.

- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A. and Finley, D. (1998). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* **18**, 3149-62.
- Gorbea, C., Goellner, G. M., Teter, K., Holmes, R. K. and Rechsteiner, M. (2004). Characterization of mammalian Ecm29, a 26 S proteasome-associated protein that localizes to the nucleus and membrane vesicles. *J Biol Chem* **279**, 54849-61.
- Griffin, T. A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H. J., Kaer, L. V., Monaco, J. J. and Colbert, R. A. (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med* **187**, 97-104.
- Griffin, T. A., Slack, J. P., McCluskey, T. S., Monaco, J. J. and Colbert, R. A. (2000). Identification of proteasemblin, a mammalian homologue of the yeast protein, Ump1p, that is required for normal proteasome assembly. *Mol Cell Biol Res Commun* **3**, 212-7.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H. and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* **7**, 1062-7.
- Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T. and Huber, R. (2005). Molecular machines for protein degradation. *Chembiochem* **6**, 222-56.
- Groll, M., Brandstetter, H., Bartunik, H., Bourenkow, G. and Huber, R. (2003). Investigations on the maturation and regulation of archaeobacterial proteasomes. *J Mol Biol* **327**, 75-83.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-71.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D. H. and Huber, R. (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10976-83.
- Grziwa, A., Maack, S., Puhler, G., Wiegand, G., Baumeister, W. and Jaenicke, R. (1994). Dissociation and reconstitution of the *Thermoplasma* proteasome. *Eur J Biochem* **223**, 1061-7.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. and Wolf, D. H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* **272**, 25200-9.
- Heinemeyer, W., Ramos, P. C. and Dohmen, R. J. (2004). The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1562-78.
- Heink, S. (2005). Die proteasomale Homöostase - Dynamik der Biogenese und Turnover des humanen 20S Proteasoms. Berlin: Humboldt-Universität zu Berlin.
- Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P. M. and Kruger, E. (2005). IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9241-6.
- Hendil, K. B., Khan, S. and Tanaka, K. (1998). Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J* **332** (Pt 3), 749-54.
- Hendil, K. B., Kristensen, P. and Uerkevitz, W. (1995). Human proteasomes analysed with monoclonal antibodies. *Biochem J* **305** (Pt 1), 245-52.
- Hirano, Y., Hendil, K. B., Yashiroda, H., Iemura, S.-i., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K. and Murata, S. (2005). A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. **437**, 1381-1385.
- Huang, L., Shen, M., Chernushevich, I., Burlingame, A. L., Wang, C. C. and Robertson, C. D. (1999). Identification and isolation of three proteasome subunits and their encoding genes from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **102**, 211-23.
- Hwang, L. Y., Lieu, P. T., Peterson, P. A. and Yang, Y. (2001). Functional regulation of immunoproteasomes and transporter associated with antigen processing. *Immunol Res* **24**, 245-72.
- Jager, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D. H. and Heinemeyer, W. (1999). Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol* **291**, 997-1013.

- Jayarapu, K. and Griffin, T. A.** (2004). Protein-protein interactions among human 20S proteasome subunits and proteasassemblin. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 523-8.
- Jorgensen, L. and Hendil, K. B.** (1999). Proteasome subunit zeta, a putative ribonuclease, is also found as a free monomer. *Mol Biol Rep* **26**, 119-23.
- Kalies, K. U., Allan, S., Sergeyenko, T., Kroger, H. and Romisch, K.** (2005). The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. *Embo J* **24**, 2284-93.
- Kingsbury, D. J., Griffin, T. A. and Colbert, R. A.** (2000). Novel propeptide function in 20 S proteasome assembly influences beta subunit composition. *J Biol Chem* **275**, 24156-62.
- Kloetzel, P. M.** (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 179-87.
- Kloetzel, P. M. and Ossendorp, F.** (2004). Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **16**, 76-81.
- Knecht, E. and Rivett, A. J.** (2000). Intracellular Localization of Proteasomes. In *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis*, (eds W. Hilt and D. H. Wolf), pp. 176-185: Landes Bioscience.
- Knuehl, C., Seelig, A., Brecht, B., Henklein, P. and Kloetzel, P. M.** (1996). Functional analysis of eukaryotic 20S proteasome nuclear localization signal. *Exp Cell Res* **225**, 67-74.
- Kruger, E., Kloetzel, P. M. and Enenkel, C.** (2001). 20S proteasome biogenesis. *Biochimie* **83**, 289-93.
- Kuckelkorn, U., Frentzel, S., Kraft, R., Kostka, S., Groettrup, M. and Kloetzel, P. M.** (1995). Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. *Eur J Immunol* **25**, 2605-11.
- Kuckelkorn, U., Ruppert, T., Strehl, B., Jungblut, P. R., Zimny-Arndt, U., Lamer, S., Prinz, I., Drung, I., Kloetzel, P. M., Kaufmann, S. H. *et al.*** (2002). Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* **195**, 983-90.
- Kwon, Y. D., Nagy, I., Adams, P. D., Baumeister, W. and Jap, B. K.** (2004). Crystal structures of the Rhodococcus proteasome with and without its pro-peptides: implications for the role of the propeptide in proteasome assembly. *J Mol Biol* **335**, 233-45.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lafarga, M., Fernandez, R., Mayo, I., Berciano, M. T. and Castano, J. G.** (2002). Proteasome dynamics during cell cycle in rat Schwann cells. *Glia* **38**, 313-28.
- Lehmann, A., Janek, K., Braun, B., Kloetzel, P. M. and Enenkel, C.** (2002). 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J Mol Biol* **317**, 401-13.
- Liao, W., Chang, B. H., Mancini, M. and Chan, L.** (2003). Ubiquitin-dependent and -independent proteasomal degradation of apoB associated with endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, respectively, in HepG2 cells. *J Cell Biochem* **89**, 1019-29.
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R.** (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-9.
- Lupas, A., Zuhl, F., Tamura, T., Wolf, S., Nagy, I., De Mot, R. and Baumeister, W.** (1997). Eubacterial proteasomes. *Mol Biol Rep* **24**, 125-31.
- Ma, C. P., Slaughter, C. A. and DeMartino, G. N.** (1992). Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem* **267**, 10515-23.
- Machiels, B. M., Henfling, M. E., Broers, J. L., Hendil, K. B. and Ramekers, F. C.** (1995). Changes in immunocytochemical detectability of proteasome epitopes depending on cell growth and fixation conditions of lung cancer cell lines. *Eur J Cell Biol* **66**, 282-92.

- Machiels, B. M., Henfling, M. E., Schutte, B., van Engeland, M., Broers, J. L. and Ramaekers, F. C.** (1996). Subcellular localization of proteasomes in apoptotic lung tumor cells and persistence as compared to intermediate filaments. *Eur J Cell Biol* **70**, 250-9.
- Mayr, J., Wang, H. R., Nederlof, P. and Baumeister, W.** (1999). The import pathway of human and *Thermoplasma* 20S proteasomes into HeLa cell nuclei is different from that of classical NLS-bearing proteins. *Biol Chem* **380**, 1183-92.
- McCutchen-Maloney, S. L., Matsuda, K., Shimbara, N., Binns, D. D., Tanaka, K., Slaughter, C. A. and DeMartino, G. N.** (2000). cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. *J Biol Chem* **275**, 18557-65.
- Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P. M. and Kruger, E.** (2003). Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of mammalian proteasomes. *J Biol Chem*.
- Mengual, E., Arizti, P., Rodrigo, J., Gimenez-Amaya, J. M. and Castano, J. G.** (1996). Immunohistochemical distribution and electron microscopic subcellular localization of the proteasome in the rat CNS. *J Neurosci* **16**, 6331-41.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. and Sommer, T.** (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**, 766-72.
- Mullapudi, S., Pullan, L., Bishop, O. T., Khalil, H., Stoops, J. K., Beckmann, R., Kloetzel, P. M., Kruger, E. and Penczek, P. A.** (2004). Rearrangement of the 16S precursor subunits is essential for the formation of the active 20S proteasome. *Biophys J* **87**, 4098-105.
- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D. B. and Monaco, J. J.** (1997). Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *Embo J* **16**, 5363-75.
- Nannmark, U., Kitson, R. P., Johansson, B. R., Rivett, A. J. and Goldfarb, R. H.** (1996). Immunocytochemical localization of multicatalytic protease complex (proteasome) during generation of murine IL-2-activated natural killer (A-NK) cells. *Eur J Cell Biol* **71**, 402-8.
- Nederlof, P. M., Wang, H. R. and Baumeister, W.** (1995). Nuclear localization signals of human and *Thermoplasma* proteasomal alpha subunits are functional in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12060-4.
- Newman, R. H., Whitehead, P., Lally, J., Coffey, A. and Freemont, P.** (1996). 20S human proteasomes bind with a specific orientation to lipid monolayers in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1281**, 111-6.
- Olink-Coux, M., Arcangeletti, C., Pinardi, F., Minisini, R., Huesca, M., Chezzi, C. and Scherrer, K.** (1994). Cytolocation of prosome antigens on intermediate filament subnetworks of cytokeratin, vimentin and desmin type. *J Cell Sci* **107** (Pt 3), 353-66.
- Orlowski, M., Cardozo, C. and Michaud, C.** (1993). Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* **32**, 1563-72.
- Orlowski, M. and Wilk, S.** (2000). Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* **383**, 1-16.
- Ortega, J., Heymann, J. B., Kajava, A. V., Ustrell, V., Rechsteiner, M. and Steven, A. C.** (2005). The axial channel of the 20S proteasome opens upon binding of the PA200 activator. *J Mol Biol* **346**, 1221-7.
- Palmer, A., Mason, G. G., Paramio, J. M., Knecht, E. and Rivett, A. J.** (1994). Changes in proteasome localization during the cell cycle. *Eur J Cell Biol* **64**, 163-75.
- Palmer, A., Rivett, A. J., Thomson, S., Hendil, K. B., Butcher, G. W., Fuertes, G. and Knecht, E.** (1996). Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem J* **316** (Pt 2), 401-7.

- Pamnani, V., Haas, B., Puhler, G., Sanger, H. L. and Baumeister, W.** (1994). Proteasome-associated RNAs are non-specific. *Eur J Biochem* **225**, 511-9.
- Patel, S. D., Monaco, J. J. and McDevitt, H. O.** (1994). Delineation of the subunit composition of human proteasomes using antisera against the major histocompatibility complex-encoded LMP2 and LMP7 subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 296-300.
- Peters, J. M., Cejka, Z., Harris, J. R., Kleinschmidt, J. A. and Baumeister, W.** (1993). Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol* **234**, 932-7.
- Pickart, C. M. and Eddins, M. J.** (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 55-72.
- Possik, P. A., Sommer, C. A., Issa Hori, J., Machado-Santelli, G. M., Jamur, M. C. and Henrique-Silva, F.** (2004). DSCR2, a Down syndrome critical region protein, is localized to the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *Eur J Histochem* **48**, 267-72.
- Preiss, T. W. and Hentze, M.** (2003). Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* **25**, 1201-11.
- Ramos, P. C., Hockendorff, J., Johnson, E. S., Varshavsky, A. and Dohmen, R. J.** (1998). Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* **92**, 489-99.
- Ramos, P. C., Marques, A. J., London, M. K. and Dohmen, R. J.** (2004). Role of C-terminal extensions of subunits beta2 and beta7 in assembly and activity of eukaryotic proteasomes. *J Biol Chem* **279**, 14323-30.
- Reits, E. A., Benham, A. M., Plougastel, B., Neefjes, J. and Trowsdale, J.** (1997). Dynamics of proteasome distribution in living cells. *Embo J* **16**, 6087-94.
- Rivett, A. J.** (1998). Intracellular distribution of proteasomes. *Curr Opin Immunol* **10**, 110-4.
- Rivett, A. J., Palmer, A. and Knecht, E.** (1992). Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J Histochem Cytochem* **40**, 1165-72.
- Rock, K. L., York, I. A., Saric, T. and Goldberg, A. L.** (2002). Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* **80**, 1-70.
- Romisch, K.** (1999). Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci* **112** (Pt 23), 4185-91.
- Ryabova, L. V., Virtanen, I., Olink-Coux, M., Scherrer, K. and Vassetzky, S. G.** (1994). Distribution of prosome proteins and their relationship with the cytoskeleton in oogenesis of *Xenopus laevis*. *Mol Reprod Dev* **37**, 195-203.
- Salzmann, U., Kral, S., Braun, B., Standera, S., Schmidt, M., Kloetzel, P. M. and Sijts, A.** (1999). Mutational analysis of subunit i beta2 (MECL-1) demonstrates conservation of cleavage specificity between yeast and mammalian proteasomes. *FEBS Lett* **454**, 11-5.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satoh, K., Sasajima, H., Nyomura, K. I., Yokosawa, H. and Sawada, H.** (2001). Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit. *Biochemistry* **40**, 314-9.
- Schmidt, M. and Kloetzel, P. M.** (1997). Biogenesis of eukaryotic 20S proteasomes: the complex maturation pathway of a complex enzyme. *Faseb J* **11**, 1235-43.
- Schmidt, M., Schmidtke, G. and Kloetzel, P. M.** (1997). Structure and structure formation of the 20S proteasome. *Mol Biol Rep* **24**, 103-12.
- Schmidt, M., Zantopf, D., Kraft, R., Kostka, S., Preissner, R. and Kloetzel, P. M.** (1999). Sequence information within proteasomal prosequences mediates efficient integration of beta-subunits into the 20 S proteasome complex. *J Mol Biol* **288**, 117-28.

- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frommel, C., Lowe, J., Huber, R., Kloetzel, P. M. and Schmidt, M. (1996). Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *Embo J* **15**, 6887-98.
- Schmidtke, G., Schmidt, M. and Kloetzel, P. M. (1997). Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes. *J Mol Biol* **268**, 95-106.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W. and Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes [see comments]. *Nature* **404**, 770-4.
- Seemuller, E., Lupas, A. and Baumeister, W. (1996). Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature* **382**, 468-71.
- Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R. and Baumeister, W. (1995a). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* **268**, 579-82.
- Seemuller, E., Lupas, A., Zuhl, F., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1995b). The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is neither a cysteine nor a serine protease. *FEBS Lett* **359**, 173-8.
- Sibille, C., Gould, K. G., Willard-Gallo, K., Thomson, S., Rivett, A. J., Powis, S., Butcher, G. W. and De Baetselier, P. (1995). LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr Biol* **5**, 923-30.
- Skilton, H. E., Eperon, I. C. and Rivett, A. J. (1991). Co-purification of a small RNA species with multicatalytic proteinase (proteasome) from rat liver. *FEBS Lett* **279**, 351-5.
- Strehl, B., Seifert, U., Kruger, E., Heink, S., Kuckelkorn, U. and Kloetzel, P. M. (2005). Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* **207**, 19-30.
- Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., De Mot, R. and Baumeister, W. (1995). The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr Biol* **5**, 766-74.
- Tanaka, K., Ii, K., Ichihara, A., Waxman, L. and Goldberg, A. L. (1986). A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. *J Biol Chem* **261**, 15197-203.
- Tanaka, K., Tamura, T., Yoshimura, T. and Ichihara, A. (1992). Proteasomes: protein and gene structures. *New Biol* **4**, 173-87.
- Tanaka, K., Yoshimura, T., Tamura, T., Fujiwara, T., Kumatori, A. and Ichihara, A. (1990). Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. *FEBS Lett* **271**, 41-6.
- Thomson, S. and Rivett, A. J. (1996). Processing of N3, a mammalian proteasome beta-type subunit. *Biochem J* **315** (Pt 3), 733-8.
- Tsuchiya, N., Fukuda, H., Nakashima, K., Nagao, M., Sugimura, T. and Nakagama, H. (2004). LRP130, a single-stranded DNA/RNA-binding protein, localizes at the outer nuclear and endoplasmic reticulum membrane, and interacts with mRNA in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 736-43.
- Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N. and Tsukihara, T. (2002). The Structure of the Mammalian 20S Proteasome at 2.75 Å Resolution. *Structure (Camb)* **10**, 609-18.
- Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt, G. and Rechsteiner, M. (2002). PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *Embo J* **21**, 3516-25.
- van Hall, T., Sijts, A., Camps, M., Offringa, R., Melief, C., Kloetzel, P. M. and Ossendorp, F. (2000). Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J Exp Med* **192**, 483-94.
- Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**, 1015-68.

- Wang, H. R., Kania, M., Baumeister, W. and Nederlof, P. M.** (1997). Import of human and *Thermoplasma* 20S proteasomes into nuclei of HeLa cells requires functional NLS sequences. *Eur J Cell Biol* **73**, 105-13.
- Weissman, A. M.** (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 169-78.
- Wendler, P., Lehmann, A., Janek, K., Baumgart, S. and Enenkel, C.** (2004). The bipartite nuclear localization sequence of Rpn2 is required for nuclear import of proteasomal base complexes via karyopherin alphabeta and proteasome functions. *J Biol Chem* **279**, 37751-62.
- Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. and Baumeister, W.** (1994). Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett* **349**, 205-9.
- Werner, E. D., Brodsky, J. L. and McCracken, A. A.** (1996). Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13797-801.
- Whitby, F. G., Masters, E. I., Kramer, L., Knowlton, J. R., Yao, Y., Wang, C. C. and Hill, C. P.** (2000). Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408**, 115-20.
- Wilk, S. and Orlowski, M.** (1983). Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem* **40**, 842-9.
- Wilkinson, C. R., Wallace, M., Morphew, M., Perry, P., Allshire, R., Javerzat, J. P., McIntosh, J. R. and Gordon, C.** (1998). Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast. *Embo J* **17**, 6465-76.
- Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P. M. and Kruger, E.** (2000). Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol* **301**, 1-9.
- Wojcik, C. and DeMartino, G. N.** (2003). Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 579-89.
- Wojcik, C., Paweletz, N. and Schroeter, D.** (1995). Localization of proteasomal antigens during different phases of the cell cycle in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* **68**, 191-8.
- Yang, Y., Fruh, K., Ahn, K. and Peterson, P. A.** (1995). In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem* **270**, 27687-94.
- Yao, Y., Toth, C. R., Huang, L., Wong, M. L., Dias, P., Burlingame, A. L., Coffino, P. and Wang, C. C.** (1999). alpha5 subunit in *Trypanosoma brucei* proteasome can self-assemble to form a cylinder of four stacked heptamer rings. *Biochem J* **344 Pt 2**, 349-58.
- Yewdell, J. W.** (2001). Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol* **11**, 294-7.
- Yewdell, J. W.** (2003). Immunology. Hide and seek in the peptidome. *Science* **301**, 1334-5.
- Yoshimura, T., Kameyama, K., Takagi, T., Ikai, A., Tokunaga, F., Koide, T., Tanahashi, N., Tamura, T., Cejka, Z., Baumeister, W. et al.** (1993). Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol* **111**, 200-11.
- Young, P., Deveraux, Q., Beal, R. E., Pickart, C. M. and Rechsteiner, M.** (1998). Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J Biol Chem* **273**, 5461-7.
- Zaiss, D. M., Standera, S., Holzthutter, H., Kloetzel, P. and Sijts, A. J.** (1999). The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes. *FEBS Lett* **457**, 333-8.
- Zaiss, D. M., Standera, S., Kloetzel, P. M. and Sijts, A. J.** (2002). PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14344-9.
- Zuhl, F., Seemuller, E., Golbik, R. and Baumeister, W.** (1997a). Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome. *FEBS Lett* **418**, 189-94.
- Zuhl, F., Tamura, T., Dolenc, I., Cejka, Z., Nagy, I., De Mot, R. and Baumeister, W.** (1997b). Subunit topology of the *Rhodococcus* proteasome. *FEBS Lett* **400**, 83-90.

- Zwickl, P., Grziwa, A., Puhler, G., Dahlmann, B., Lottspeich, F. and Baumeister, W.** (1992a). Primary structure of the Thermoplasma proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry* **31**, 964-72.
- Zwickl, P., Kleinz, J. and Baumeister, W.** (1994). Critical elements in proteasome assembly. *Nat Struct Biol* **1**, 765-70.
- Zwickl, P., Lottspeich, F. and Baumeister, W.** (1992b). Expression of functional Thermoplasma acidophilum proteasomes in Escherichia coli. *FEBS Lett* **312**, 157-60.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	min.	Minuten
bzw.	beziehungsweise	Mikro	Mikrosomen
cDNA	<i>complementary DNA</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
CHX	Cycloheximid	NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
Cyt	Cytoplasma	OD	Optische Dichte
DMSO	Dimethylsulfoxid	PA	<i>proteasome activator</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat	pAK	polyklonaler Antikörper
DTT	Dithiotreitol	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum	POMP	<i>proteasome maturation protein</i>
ERAD	<i>ER associated degradation</i>	Pre20S	<i>20S proteasome precursor</i>
evt.	eventuell	Pro	Proform
FRAP	<i>fluorescence recovery after photo bleaching</i>	re	<i>reverse</i>
fw	<i>forward</i>	RNase	<i>ribonucleic acid</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
h	Stunde	RT	Raumtemperatur
IFN γ	Interferon γ	S	Sedimentationskoeffizient
HPM	Hundepankreasmikrosomen	s.	siehe
HSP	Hitzeschockprotein	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
IP	Immunpräzipitation	siRNA	<i>short interference RNA</i>
Kap.	Kapitel	Tab.	Tabelle
kb	Kilobasenpaare	TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
kDa	Kilodalton	Term	Terminal
LB	Luria-Bertani-Medium	ü. N.	über Nacht
M	mol / l	UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
mAK	monoklonaler Antikörper	wt	wildtyp
mat	maturiert	#	Fraktion

Publikationen

Heink S., Fricke B., Ludwig D., Kloetzel PM. und Krüger E. (2006). Tumor cell lines expressing the proteasome subunit isoform LMP7E1 exhibit immunoproteasome deficiency. *Cancer Res* **66(2)**, 649-652

Manuskript in Vorbereitung:

Fricke B., Heink S., Kloetzel PM. und Krüger E. The Proteasome Maturation Protein POMP Provides a Molecular Docking Site for 20S Proteasome Formation at the Endoplasmic Reticulum.

Poster:

Fricke B., Ludwig D., Kloetzel PM. und Krüger E. Localisation of 20S Proteasome Assembly in Mammalian Cells. *IXth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control*, 2005, BRDO Slowenien

Berlin, 29.03.2006

Danksagung

Ich möchte mich zuallererst bei den Menschen bedanken, die am meisten zu dieser Arbeit beigetragen haben: bei Herr Prof. Peter-Michael Kloetzel und Dr. Elke Krüger, die mir das Thema überlassen haben und darüber hinaus ein freies wissenschaftliches Arbeiten mit immerwährenden Diskussionsangeboten ermöglicht haben.

Vielen Dank den Gutachtern und Mitgliedern des Promotionsausschusses für die mit dieser Arbeit entstehenden Mühen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Melanie Rieger, die nicht nur die Arbeit mit mir am Ende noch hundertmal durchgegangen ist, sondern die mir auch die letzten zweieinhalb Jahre im Labor versüßt hat.

Für wissenschaftliche Fragen, Diskussionen und Hilfestellungen standen auch im besonderen Maße Dr. Ulrike Kuckelkorn, Prof. Burkhardt Dahlmann, Dr. Cordula Enenkel und Dr. Michael Seeger zur Verfügung. Dafür Danke !

Für einen Haufen an gereinigtem 20S Proteasomen für die 2D-Gele danke ich Ilse Drung.

Für engagierte Mithilfe im Labor und auch tatkräftige Unterstützung während der Experimente danke ich Sylvia Heink, Daniela Ludwig und Elke Bürger.

Besonderer Dank für schöne Laborstunden gilt nochmals Melanie Rieger und auch den Mitstreitern Sandra Jäckel, Martin Keller, Andrea Schulze und Sylvia Heink.

Und allen anderen Postdocs, Doktoranden, Technischen Assistenten, Auszubildenden, Sekretärinnen, Wissenschaftsmanagerinnen danke ich für eine gute Arbeitsatmosphäre.

Über das Institut hinaus danke ich meinen Eltern für den ständigen Versuch meine Arbeit zu verstehen und natürlich den Rückhalt und die Unterstützung, die mir zuteil wurden. Und im besonderen für einen Fluchtort in Südfrankreich !

Und zuallerletzt meinen Freunden, die mich über diese Zeit begleitet haben. Im besondern Florian, Paul, Philipp und dem Silvesterteam, dass das Ruder rumgerissen hat. Und nochmals möchte ich mich auch hier herzlichst bei Melanie und Martin bedanken, die sehr viel mehr als Labormitstreiter waren und sind.

Erklärung

Hiermit versichere ich die Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, 29.03.2006